

**CHARAKTERISIERUNG BRONCHOPULMONALER  
NEUROENDOKRINER NEOPLASIEN ANHAND  
AUSGEWÄHLTER MARKER**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Apothekerin und Dipl. pharm. Elisa Neubauer, geb. Specht,  
geboren am 28.05.1988 in Eisenach

## **Gutachter**

**1. apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp**

Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Jena,  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

**2. Prof. Dr. med. Dieter Hörsch**

Klinik für Innere Medizin, Gastroenterologie und Endokrinologie,  
Zentralklinik Bad Berka

**3. Prof. Dr. rer. nat. Oliver Werz**

Institut für Pharmazie, Lehrstuhl Pharmazeutische / Medizinische Chemie,  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.04.2017**

„Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum Erkennen,  
den Glauben zum Handeln.“

*Max Planck (1858-1947)*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Bronchopulmonale neuroendokrine Neoplasien .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Einordnung in die neuroendokrinen Neoplasien .....	3
2.1.2 Definition der bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien .....	4
2.1.3 Klassifikation .....	5
2.1.3.1 Typische Karzinoide .....	6
2.1.3.2 Atypische Karzinoide .....	7
2.1.3.3 Kleinzellige Bronchialkarzinome .....	8
2.1.3.4 Großzellige neuroendokrine Bronchialkarzinome .....	9
2.1.4 Diagnostik .....	10
2.1.5 Grading und Staging .....	12
2.1.6 Therapie.....	13
<b>2.2 Somatostatinrezeptoren .....</b>	<b>14</b>
2.2.1 Somatostatin .....	14
2.2.2 Somatostatinrezeptoren.....	15
2.2.3 Klinische Relevanz von Somatostatinrezeptoren .....	17
2.2.3.1 Synthetische Somatostatin-Analoga .....	17
2.2.3.2 Somatostatin-Analoga in der Peptidrezeptor-vermittelten Radionuklidtherapie .....	19
2.2.3.3 Radionuklid-markierte Somatostatin-Analoga in der bildgebenden Diagnostik .....	20
<b>2.3 Proliferationsmarker .....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Ki-67 .....	21
2.3.2 Topoisomerase 2 alpha .....	23
2.3.3 Rac GTPase-aktivierendes Protein 1 .....	25
<b>3 ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>29</b>



<b>4</b>	<b>PUBLIZIERTE ORIGINALARBEITEN</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Manuskript I</b>	<b>31</b>
	<i>Somatostatin Receptors in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms: New Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Markers.</i>	
	Kaemmerer D., Specht E., Sanger J., Wirtz R.M., Sayeg M., Schulz S., Lupp A.	
	J Clin Endocrinol Metab, 100 (3):831-840, 2015.	31
<b>4.2</b>	<b>Manuskript II</b>	<b>43</b>
	<i>Comparison of Immunoreactive Score, HER2/neu Score and H Score for the Immunohistochemical Evaluation of Somatostatin Receptors in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms.</i>	
	Specht E., Kaemmerer D., Sanger J., Wirtz R.M., Schulz S., Lupp A.	
	Histopathology, 67 (3):368-377, 2015.	43
<b>4.3</b>	<b>Manuskript III</b>	<b>55</b>
	<i>Comparative Evaluation of Three Proliferation Markers, Ki-67, TOP2A, and RacGAP1, in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms: Issues and Prospects.</i>	
	Neubauer E., Wirtz R.M., Kaemmerer D., Athelougu M., Schmidt L., Sänger J., Lupp A.	
	Oncotarget, DOI:10.18632/oncotarget.9747, 2016.	55
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>72</b>
<b>6.1</b>	<b>Patienten und Methodik</b>	<b>72</b>
6.1.1	Patientencharakteristika	72
6.1.2	Markerauswahl	73
6.1.3	Methodenauswahl	73
<b>6.2</b>	<b>SSTR-Expression in BP-NEN</b>	<b>74</b>
6.2.1	SSTR-Expressionscharakteristika in der immunhistochemischen Färbung	76
6.2.2	Vergleich der immunhistochemischen Scores zur SSTR-Evaluierung	76
6.2.3	SSTR-Expressionshäufigkeiten und -intensitäten	78
6.2.4	Intraindividuelle Standardabweichung der SSTR-Expression in der Immunhistochemie	80
6.2.5	Korrelationen der SSTR-Expression mit klinischen und histopathologischen Patientendaten	81
6.2.6	SSTR-Expression im Vergleich zwischen Immunhistochemie und qRT-PCR	81
6.2.7	Bedeutung der SSTR in Diagnose und Therapie von BP-NEN	82
<b>6.3</b>	<b>Expression der Proliferationsmarker Ki-67, TOP2A und RacGAP1 in BP-NEN</b>	<b>84</b>
6.3.1	Expressionshäufigkeiten und -intensitäten von Ki-67, TOP2A und RacGAP1	86
6.3.2	Problematik der Ki-67-Auswertung	88
6.3.2.1	Auswertungsmethoden	88

6.3.2.2	Untersucher-bedingte Variabilität der immunhistochemischen Auswertung.....	91
6.3.2.3	Cut-off-Werte zur Abgrenzung der Entitäten .....	92
6.3.3	TOP2A als prädiktiver Biomarker in BP-NEN .....	94
6.3.4	RacGAP1 als Marker für Invasivität.....	95
6.3.5	Korrelation der Proliferationsmarker mit klinischen und histopathologischen Patientendaten .....	97
6.3.6	Proliferationsmarker-Expression im Vergleich zwischen Immunhistochemie und qRT-PCR.....	99
6.3.7	Klinische Anwendbarkeit von Ki-67, TOP2A und RacGAP1.....	100
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>102</b>
	<b>LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>104</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>VIII</b>
A)	Supplemental Data Manuskript I.....	VIII
B)	Supplemental Data Manuskript III .....	XIV
	<b>Danksagung.....</b>	<b>XVI</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>XVII</b>
	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>XVIII</b>
	<b>Wissenschaftliche Beiträge .....</b>	<b>XIX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AC	Atypical Carcinoid, Atypisches Karzinoid
ACTH	Adrenocorticotropin
AJCC	American Joint Committee on Cancer
BP-NEN	Bronchopulmonale neuroendokrine Neoplasien
Cdc42	Cell Division Cycle 42
CgA	Chromogranin A
CT	Computertomographie
DFC	Dense Fibrillar Components
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DOTANOC	[DOTA <sup>0</sup> -1-Nal <sup>3</sup> ]-Octreotid
DOTATATE	[DOTA <sup>0</sup> , Tyr <sup>3</sup> ]-Octreotat
DOTATOC	[DOTA <sup>0</sup> , Tyr <sup>3</sup> ]-Octreotid
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
EZM	Extrazelluläre Matrix
<sup>18</sup> FDG	<sup>18</sup> Fluordesoxyglucose
FFPE	Paraffin-eingebettete, Formalin-fixierte Tumorproben
GAP	GTPase-activating Protein, GTPase-aktivierendes Protein
GDI	Guanin-nucleotide-dissociation Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-nucleotide-exchange Factor
GEP-NEN	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone, Somatoliberin
G-Segment	Gate-Segment
GTP	Guanosintriphosphat
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HPF	High-power Field, Hauptgesichtsfeld
HWZ	Halbwertszeit
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
IFN	Interferon
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
Ki-67-LI	Ki-67-Labeling-Index

LCNEC	Large Cell Neuroendocrine Lung Carcinoma, Großzelliges neuroendokrines Bronchialkarzinom
MEN I	Multiple endokrine Neoplasie I
MRT	Magnetresonanztomographie
NANETS	North American Neuroendocrine Tumor Society
NEC	Neuroendokrine Karzinome
NEN	Neuroendokrine Neoplasien
NET	Neuroendokrine Tumore
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PRRT	Peptidrezeptor-vermittelte Radionuklid-Therapie
Rac	Ras-related C3
RacGAP1	Rac GTPase-aktivierendes Protein 1
Rho	Ras Homologous
SCLC	Small Cell Lung Cancer, Kleinzelliges Bronchialkarzinom
SDF-1	Stromal Cell-derived Factor 1
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
SRS	Somatostatinrezeptor-Szintigrafie
SSA	Somatostatin-Analoga
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatinrezeptor
Syn	Synaptophysin
TC	Typical Carcinoid, Typisches Karzinoid
TM	Transmembranäre Domäne
TMA	Tissue Microarray
TOP2A	Topoisomerase 2 alpha
TOP2B	Topoisomerase 2 beta
T-Segment	Transfer-Segment
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WHO	World Health Organization

## 1 Zusammenfassung

Jährlich sterben in Deutschland etwa 43.000 Menschen an Lungenkrebs. Es ist die am häufigsten tödlich verlaufende Krebserkrankung auf der Nordhalbkugel. 20-25% dieser Tumore sind neuroendokriner Genese und können als bronchopulmonale neuroendokrine Neoplasien (BP-NEN) bezeichnet werden. Sie stellen eine heterogene Tumorgruppe dar, welche wiederum in die Typischen Karzinoide (TC) (*low-grade*) mit günstiger Prognose, die Atypischen Karzinoide (AC) (*intermediate-grade*) sowie die schlecht-differenzierten Kleinzelligen Bronchi-alkarzinome (SCLC) und Großzelligen neuroendokrinen Bronchi-alkarzinome (LCNEC) (*high-grade*) mit aggressivem Krankheitsverlauf unterteilt werden können. Die BP-NEN sind nur unzureichend charakterisiert, sodass die molekulare Basis für einige diagnostische und therapeutische Interventionen fehlt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die BP-NEN auf Marker mit vorwiegend klinischer Relevanz hin zu untersuchen, um den Patienten neue Behandlungsmöglichkeiten zu eröffnen.

Durch eine Kooperation mit der Zentralklinik Bad Berka, einem ENETS Center of Excellence, wurden für die vorliegende Studie Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Tumorproben mit den dazugehörigen klinischen Daten von insgesamt 115 BP-NEN-Patienten (26 TC, 30 AC, 52 SCLC, 7 LCNEC) zur Verfügung gestellt. Diese wurden zum einen auf Proteinebene durch eine Immunhistochemie (IHC) und zum anderen auf mRNA-Ebene durch eine qRT-PCR auf die Somatostatinrezeptoren (SSTR) 1, 2A, 3, 4, 5 sowie die Proliferationsmarker Ki-67, Topoisomerase 2 alpha (TOP2A) und RacGAP1 untersucht.

SSTR sind in den gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN) bereits fester Bestandteil in der Diagnose (SSTR-basierte PET/CT oder -Szintigrafie) und Therapie (pharmakologisch mit Somatostatin-Analoga (SSA) und Peptidrezeptor-vermittelter Radionuklid-Therapie). Den BP-NEN-Patienten hingegen stehen diese Möglichkeiten bislang nicht zur Verfügung, da die molekulare Grundlage hierfür fehlte. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass v.a. SSTR1, SSTR2A und SSTR5 sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene in ausreichender Menge in den betrachteten TC und AC, aber unerwartet auch in den SCLC exprimiert werden (Positivität jeweils ~50%), sodass die oben genannten Diagnose- und Therapieansätze ebenfalls in allen BP-NEN-Entitäten angewendet werden können. Nach einer vorausgehenden SSTR-Subtypen-Stratifizierung sollten im Falle einer SSTR2A-Expression die herkömmlichen SSA wegen des günstigeren Nebenwirkungsprofils gewählt und bei den übrigen SSTR-positiven Fällen Pan-SSA eingesetzt werden. Eine Besonderheit stellte sich für den SSTR1 heraus: Er war in 80% der TC / AC, in SCLC hingegen kaum bis gar nicht exprimiert, sodass dieser Rezeptorsubtyp als zusätzlicher histopathologischer Cut-off-Marker zur Abgrenzung der AC von den SCLC dienen könnte. Somit ergab sich neben dem diagnostischen und therapeutischen Nutzen der SSTR in BP-NEN auch eine

gute prognostische Aussagekraft, indem steigende SSTR1-Werte mit einem signifikant besseren Patientenüberleben korrelieren.

Durch die verschiedenen SSTR-Bindungsspektren neuer SSA wird die vorherige Bestimmung des Rezeptor-Profiles eines Patienten immer bedeutender. Da die SSTR-Expression heterogen ist, die IHC-Evaluierung in den bisherigen Studien aber stark variiert, ist eine standardisierte Aussage zu daraus resultierenden Interventionen schwer möglich. Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, drei bewährte Scoring-Systeme miteinander zu vergleichen. Trotz guter Korrelationen zwischen allen Scores, war der IRS überlegen, da er im Vergleich zum HER2/neu-Score die Färbeintensität und die prozentualen Anteile der gefärbten Tumoreale einbezieht und im Gegensatz zum H-Score dennoch praktikabel im Handling bleibt.

Die Klassifikation und das Grading der BP-NEN befinden sich derzeit in einer Optimierungsphase. Hierfür wird die Eignung des Ki-67-Labeling-Indexes seit geraumer Zeit aufgrund vieler offener Fragen kontrovers diskutiert. Auf diese sollte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls näher eingegangen werden: Zur Problematik der optimalen Auswertungsmöglichkeit zeigte sich, dass die manuell-visuelle Evaluierung der IHC-Präparate zwar am geläufigsten ist, für eine standardisierte Aussage jedoch ein einheitliches Auswertungssystem benötigt wird. Die häufig verwendete Evaluierung von 2000 Tumorzellen in den Hotspot-Arealen bei 400-facher Vergrößerung zeigte dabei gute Ergebnisse. Die automatisierte Auswertung der IHC-Präparate muss für deren klinischen Einsatz noch optimiert werden. Als eine neue vielversprechende Methodik stellte sich die Ki-67-mRNA-Quantifizierung mit einer qRT-PCR heraus.

In Bezug auf die Frage nach optimalen Cut-off-Werten zwischen den BP-NEN-Entitäten ergaben sich in der manuell-visuellen Ki-67-Evaluierung Grenzwerte von 1,5% zwischen TC und AC sowie 19% / 23,5% zwischen AC und SCLC / LCNEC. Diese Werte sind vergleichbar mit denen der GEP-NEN. Schließlich wird für die BP-NEN ein dreifach-gestütztes Gradingssystem vorgeschlagen, welches die Ki-67-Auswertung beinhaltet und in grenzwertigen Fällen ergänzend die Auszählung der Mitoserate und die Ermittlung des Nekroseausmaßes einbezieht.

Bei der Betrachtung der TOP2A und des RacGAP1 stellte sich heraus, dass sich die erstere im Vergleich zum Ki-67 lediglich durch den Vorteil einer prädiktiven Aussage zu einer TOP2-basierten Therapie absetzt. Das RacGAP1 zeigte sich sowohl in der Literatur, als auch in dieser Studie als ein neuer Marker mit vielen Tumor-promovierenden Eigenschaften, der im Vergleich zu den beiden anderen Markern auf Proteinebene eine noch bessere prognostische Aussagekraft v.a. bei SCLC-Patienten hat.

Zusammenfassend konnte das Wissen über den molekularen Status der BP-NEN in der vorliegenden Arbeit erweitert werden, so dass den Patienten zukünftig verbesserte Diagnostiken und Therapien ermöglicht werden können. Dabei bietet die Arbeit ein gutes Beispiel für die Relevanz der individualisierten Medizin, indem bewährte und moderne molekulare *in-vitro*-Techniken als Grundlage für eine *in-vivo*-Diagnostik und -Therapie dienen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Bronchopulmonale neuroendokrine Neoplasien

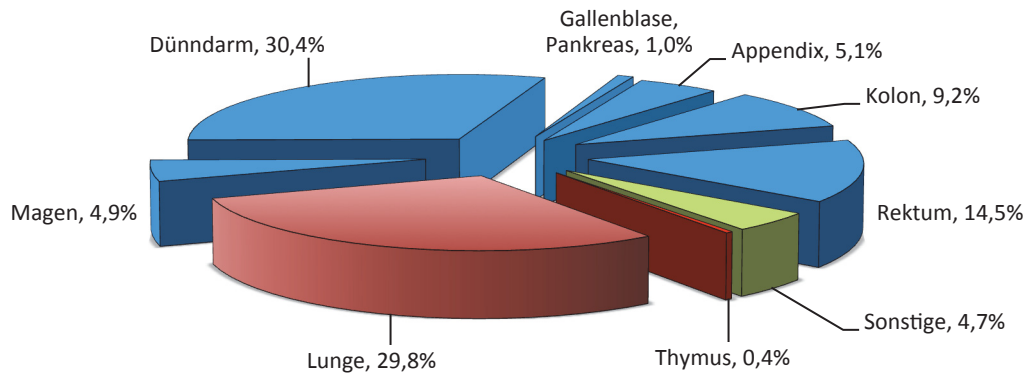
#### 2.1.1 Einordnung in die neuroendokrinen Neoplasien

Bei den neuroendokrinen Neoplasien (NEN) handelt es sich um eine Gruppe von malignen Tumoren, welche aus dem disseminierten neuroendokrinen System des Körpers hervorgehen und die Fähigkeit besitzen, Hormone zu produzieren. Trotz ähnlicher morphologischer Eigenschaften unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Biologie, Funktionalität, Entwicklungsmechanismen, Histologie, Genetik und Prognose (Cordoba-Chacon et al. 2010, Duran-Prado et al. 2010). NEN treten vorwiegend sporadisch auf, können aber auch Teil eines hereditären Tumorsyndroms wie der MEN Typ I-IV (Multiple endokrine Neoplasie Typ I-IV) oder des Morbus von Hippel-Lindau sein (Klöppel 2007, Klimstra 2013). Sie können in funktionelle und nicht-funktionelle Tumore eingeteilt werden, wobei die ersteren in der Lage sind, bioaktive Amine und Hormone zu produzieren, zu speichern und zu sezernieren. Diese können dann auf die jeweilige Substanz bezogene Symptome hervorrufen. Unter diesen sogenannten paraneoplastischen Syndromen ist das Karzinoid-Syndrom das bekannteste und in NEN am häufigsten vorkommende. Es verursacht durch eine Serotonin-Überproduktion charakteristische Symptome mit Diarrhoen, Flushes, Trikuspidalklappeninsuffizienz sowie Bronchialspasmen (Gustafsson et al. 2008b, Siddiqui 2010, Feelders et al. 2012).

Obwohl Oberndorfer 1907 den Begriff des „benigen“ Karzinoids prägte (Oberndorfer 1907), stellte sich im Laufe der Zeit heraus, dass NEN in allen Dignitäts- und Differenzierungsgraden existieren, welche ein unterschiedliches diagnostisches Vorgehen erfordern, um die große prognostische Spannweite abwägen zu können. Es wurde eine Reihe an Versuchen unternommen, diese heterogene Tumorgruppe einzuteilen und zu benennen, sodass eine Fülle an diagnostischen Begriffen, Klassifikationssystemen und Tumorsynonymen existiert (Pavel et al. 2013, Toumpanakis und Caplin 2013). Die World Health Organization (WHO), die European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS), das American Joint Committee on Cancer (AJCC) und die North American Neuroendocrine Tumor Society (NANETS) haben sich das Ziel gesetzt, ein einheitliches System bezüglich Einteilung, Grading und Staging zu finden (Klimstra 2013).

Aufgrund der diffusen Verteilung des neuroendokrinen Systems können NEN in einer Vielzahl an anatomischen Lokalisationen im Körper auftreten. Williams und Sandler erstellten diesbezüglich eine auf der Embryogenese basierende Gliederung der NEN in Vorderdarm-Tumore (lokalisiert in Thymus, Lunge, Bronchien, Speiseröhre, Magen, Bauchspeicheldrüse, Zwölffingerdarm, oberem Jejunum), Mitteldarm-Tumore (in Dünndarm, Dickdarm, aufsteigendem Ko-

ion befindlich) und Hinterdarm-Tumore (auftretend in Querkolon, absteigendem Kolon, Rektum) (Williams und Sandler 1963, Pavel et al. 2013). Die jeweiligen Inzidenzen sind in Abbildung 1 wiedergegeben.



**Abbildung 1: Inzidenzen von neuroendokrinen Neoplasien, bezogen auf die Lokalisation.**  
Die gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien sind in Blau, die neuroendokrinen Neoplasien in Lunge / Thymus in Rot und sonstige neuroendokrine Neoplasien in Grün dargestellt.

Wie aus Abbildung 1 ersichtlich wird, ist das Vorkommen von NEN im Gastrointestinaltrakt mit circa 67%, gefolgt vom Bronchialtrakt mit etwa 30%, am häufigsten (Modlin et al. 2003, Bertino et al. 2009). Obwohl diese Tumorklasse selten ist, wird eine steigende Inzidenz von NEN beschrieben (Taal und Visser 2004, Gustafsson et al. 2008a, Toumpanakis und Caplin 2013). So machen gastroenteropankreatische NEN (GEP-NEN) und bronchopulmonale NEN (BP-NEN) etwa 2% aller malignen Tumorentitäten aus (Taal und Visser 2004, Yao et al. 2008, Casciano et al. 2013, Maschmeyer et al. 2015). Viele gesicherte Studien liegen zur Diagnose und Therapie von GEP-NEN vor, wohingegen die Datenlage zu BP-NEN noch unzureichend ist (Toumpanakis und Caplin 2013).

### 2.1.2 Definition der bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien

Der erste Bericht über einen bronchopulmonalen neuroendokrinen Tumor wurde vermutlich durch R. Laennec (1781-1826) niedergeschrieben und im Jahr 1831 publiziert (Gustafsson et al. 2008b). Es handelt sich hierbei um eine Gruppe maligner bronchopulmonaler Neoplasien, welche aus endokrinen Zellen des Respirationstraktes entstammen und hinsichtlich ihrer grundlegenden charakteristischen mikroskopischen, morphologischen Eigenschaften den neuroendokrinen Tumoren des gesamten Körpers ähneln (Klöppel 2007, Gustafsson et al. 2008b). Immunhistochemisch können neuroendokrine Marker (Chromogranin A, Synaptophysin, CD56, NCAM) und Peptidhormone (Gastrin, Serotonin, Insulin, Bombesin, ACTH) nach-



gewiesen werden. Tumore des Vorderdarms, wie auch die BP-NEN, weisen jedoch typischerweise einen geringeren Serotonin-Gehalt und somit seltener das Auftreten eines Karzinoid-Syndroms bzw. paraneoplastischen Syndroms (etwa 3% der BP-NEN) auf als GEP-NEN (Gustafsson et al. 2008b, Siddiqui 2010, Hörsch et al. 2012).

BP-NEN nehmen innerhalb aller Lungentumore einen Anteil von etwa 20% ein (Hörsch et al. 2012). Aufgrund der meist guten Prognose ergibt sich eine beträchtliche Prävalenz. Es erkranken deutschlandweit etwa 450-750 Patienten pro Jahr und die derzeitige Prävalenz wird auf circa 5000 Patienten geschätzt (Gustafsson et al. 2008b). In den letzten Jahren wurde jedoch eine ansteigende Inzidenz registriert, welche in den Vereinigten Staaten laut SEER-Register (Surveillance, Epidemiology and End Results-Register) um etwa 6% pro Jahr zunimmt. Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt etwa 50-56 Jahre und liegt somit eine Dekade unter den nicht-neuroendokrinen Lungentumoren (Hörsch et al. 2012).

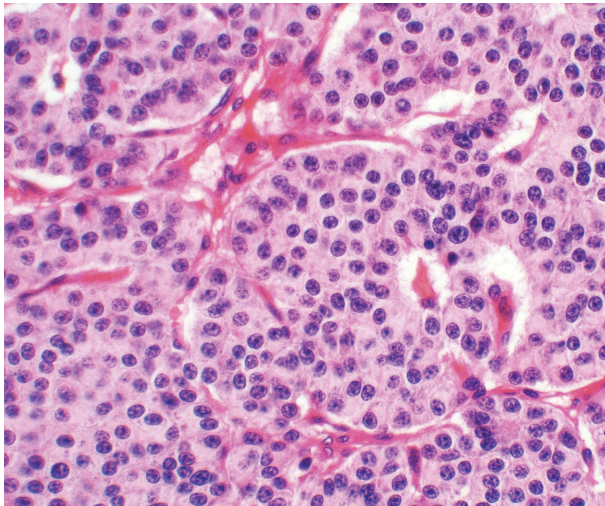
NEN des Bronchialbaums können sowohl zentral an den Bronchien, als auch peripher im Lungengewebe auftreten (Gustafsson et al. 2008b, Siddiqui 2010). Ihre Lokalisation hat Auswirkungen auf die Anzeichen und Symptome sowie die Diagnoseverfahren und das Staging. Dabei äußern sich zentral gelegene Tumore anhand mechanischer, unspezifischer Erscheinungen wie Husten, Schmerzen im Brustraum, blutige Auswürfe oder Atemnot (Bertino et al. 2009, Feelders et al. 2012, Hörsch et al. 2012). Periphere NEN zeigen oft keine Primärsymptomatik.

### 2.1.3 Klassifikation

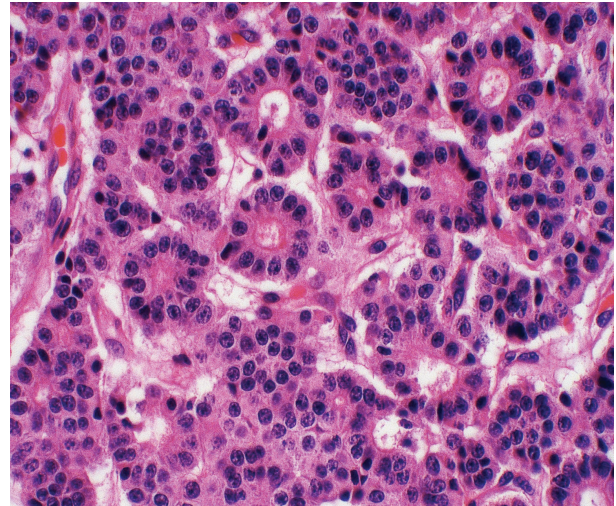
Trotz gemeinsamer Eigenschaften können die BP-NEN in 4 Tumorentitäten unterteilt werden, welche sich u.a. hinsichtlich ihrer Dignität und Differenzierung unterscheiden. Verschiedene Klassifizierungssysteme wurden im Laufe der Zeit hierfür entwickelt (Hörsch et al. 2012). Durchgesetzt hat sich letztlich die auf Travis et al. basierende WHO-Einteilung aus dem Jahre 2004, welche auch in der neuen 2015er WHO-Klassifikation bestehen bleibt. Hier wird zwischen Typischen Karzinoiden (TC) als *low-grade*-Tumore, Atypischen Karzinoiden (AC) als *intermediate-grade* sowie neuroendokrinen Karzinomen vom großzelligen (LCNEC) und kleinzelligen Typ (SCLC), welche beide als *high-grade*-Tumore eingestuft werden, unterschieden. Gemischte oder kombinierte neuroendokrine Karzinome (SCLC mit LCNEC oder SCLC bzw. LCNEC mit Adenokarzinom bzw. Plattenepithelkarzinom) treten gelegentlich auf (Hörsch et al. 2012, Caplin et al. 2015, Schnabel und Junker 2015).

### 2.1.3.1 Typische Karzinoide

TC gehören mit den AC zu den Lungen-Karzinoiden. Sie sind die am besten differenzierten BP-NEN mit der günstigsten Prognose und umfassen etwa 2% aller Lungenmalignitäten, jedoch 80-90% der Lungen-Karzinoide. Sie wachsen langsam und sind in 75% der Fälle zentral lokalisiert. Makroskopisch zeigen sie sich unauffällig als knotenförmige Masse, welche unterhalb des Bronchialepithels als glatt begrenzte, gut vaskularisierte Raumforderung wächst (Cerilli et al. 2001, Fink et al. 2001, Jeung et al. 2002). Metastasen treten bei TC selten auf und betreffen in der Regel die regionalen Lymphknoten. Nur in Ausnahmefällen werden Metastasierungen in entfernte Organe wie Leber oder Knochen beschrieben (Fink et al. 2001, Gustafsson et al. 2008b). Die 5- und 10-Jahres-Überlebensraten sind bei TC mit 87-100% bzw. 87-93% dementsprechend hoch (Hörsch et al. 2012).



**Abbildung 2: Typisches Karzinoid 1.** Organoides Wachstumsverhalten. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 400-fache Vergrößerung.



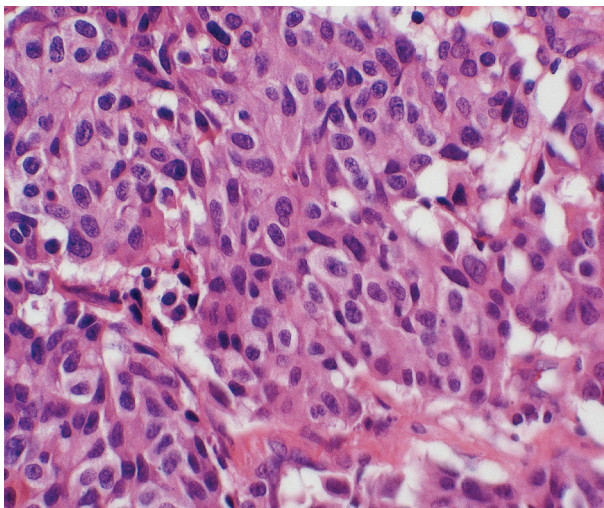
**Abbildung 3: Typisches Karzinoid 2.** Rosettenartiges Wachstum. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 400-fache Vergrößerung.

Auf histologischer Ebene sind bei den TC die Tumorzellen in Nestern oder trabekulären Banden angeordnet. Typische rosettenförmige, mikroazinäre, organoide oder drüsige Strukturen können auftreten. TC zeigen keine Nekrose. Die Tumore sind von vielen Kapillaren durchzogen, denen Tumorzellen anhängen (Abbildungen 2 und 3).

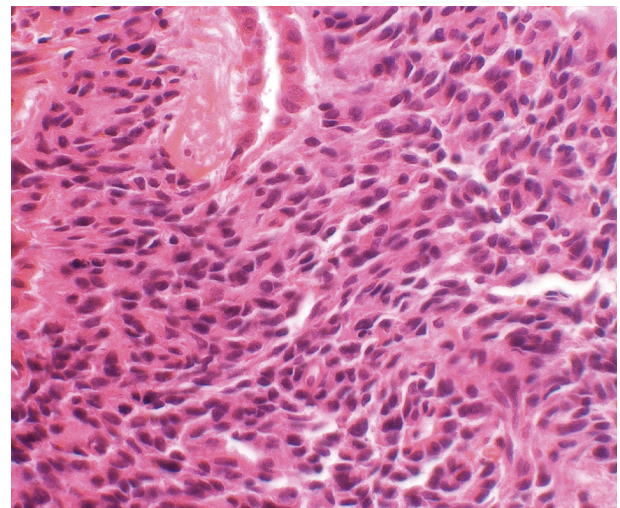
Die einzelnen Tumorzellen sind in der Regel 15-20 µm groß und durch ihre plasmazytoide, teilweise auch lymphoide Erscheinung gekennzeichnet. Das Zytoplasma ist mäßig bis karg vorhanden und weist eine feine Granularität auf (Siddiqui 2010). Es kommt kein Nuclear Molding vor. Das Chromatin zeigt die typische „Pfeffer- und Salz“-Struktur. Eine mitotische Aktivität ist gering bis gar nicht vorhanden (WHO: 1-2 Mitosen / 10 High-power Fields (HPF)) (Anderson et al. 1990).

### 2.1.3.2 Atypische Karzinoide

AC treten selten auf und umfassen 0,1-0,2% aller Lungenmalignitäten bzw. 10-20% der Lungen-Karzinoide (Jacobs et al. 2014). Sie nehmen eine Zwischenstellung zwischen TC und SCLC ein und können als mittelmäßig differenzierte Neoplasien mit einer etwas erhöhten Proliferationsrate (2-10 Mitosen / 10 HPF) beschrieben werden. Im Vergleich zu den TC wachsen sie schneller und aggressiver und metastasieren in 40-50% der Fälle in regionale Lymphknoten sowie in 20-30% der Fälle in entfernte Organe (Leber, Skelett, ZNS, Haut, Mamma) (Gustafsson et al. 2008b, Bertino et al. 2009, Siddiqui 2010). Ihre 5- / 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 40-59% bzw. 31-59% (Hörsch et al. 2012). AC sind meist peripher lokalisiert. Das mediane Alter einer Erstdiagnose liegt bei etwa 63 Jahren und ähnelt damit dem der nicht-neuroendokrinen Lungentumore. Zum Zeitpunkt der Diagnose werden bei AC, ebenso wie bei den TC, niedrigere Tumorstadien festgestellt (Modlin et al. 2003).



**Abbildung 4: Atypisches Karzinoid 1.** Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 400-fache Vergrößerung.



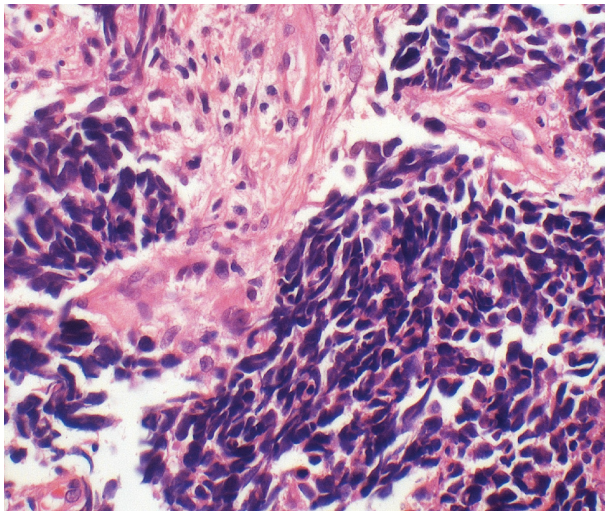
**Abbildung 5: Atypisches Karzinoid 2.** Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 400-fache Vergrößerung.

Atypische Karzinoide sind zytologisch sehr heterogen, da sie charakteristische Merkmale der TC sowie SCLC aufweisen. Ähnlich den TC treten gelegentlich rosettenartige, azinöse Strukturen und Zellpalisaden auf, jedoch erscheinen diese in den AC oft als Begleiter einer punktuellen Nekrose. Vaskuläre und lymphatische Invasionen kommen vor. Die Zellen sind plasmazytoid mit kargem bis mäßigem homogenem Zytoplasma. Es erscheinen hier vielgestaltige Tumorzellen, mit runder, ovaler bis spindelförmiger Form von mittlerer Größe und mit verschieden großen atypischen Zellkernen (Abbildungen 4 und 5) (Siddiqui 2010). „Salz- und Pfeffer“-Chromatin, Hyperchromasie und Nuclear Molding kommen vor. In der Regel sind auffällige Nucleoli erkennbar (Arrigoni et al. 1972).



### 2.1.3.3 Kleinzellige Bronchialkarzinome

SCLC treten unter den BP-NEN am häufigsten auf und machen etwa 20% aller Lungenmalignitäten aus. Ihr klinisches Verhalten ist, ebenso wie bei den LCNEC, äußerst aggressiv und resultiert in einer geringen Überlebenszeit (Warren et al. 1989, Dresler et al. 1997, Travis et al. 1998). SCLC zeigen eine ausgeprägte Metastasierung, welche in der Regel bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weit fortgeschritten ist. Typische Organe für Metastasen sind neben der Lunge und den Lymphknoten (60-75%) besonders die Knochen (10-38%), die Leber (17-34%), die Nebennieren (10-17%) und das Gehirn (> 14%) (Gustafsson et al. 2008b). In manchen Fällen können die Metastasen sogar größer sein als der Primärtumor und klinisch auffällige Symptome hervorrufen (Gustafsson et al. 2008b). Meistens werden die Patienten jedoch durch Atembeschwerden auffällig, da diese Tumore in der Regel zentral wachsen. Patienten mit einem SCLC haben eine sehr schlechte Prognose und weisen eine 5- und 10-Jahres-Überlebensrate von lediglich 9% bzw. 5% auf (Gustafsson et al. 2008b). SCLC werden häufig mit einem Nikotinabusus assoziiert: 80% der männlichen SCLC-Patienten sind Raucher (Fink et al. 2001, Siddiqui 2010). Aufgrund veränderter Rauchgewohnheiten konnte bei Frauen in den letzten 30 Jahren eine stetig steigende Inzidenz erfasst werden, obwohl diese Tumorentität vorwiegend bei Männern auftritt (Siddiqui 2010). Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 60 bis 70 Jahren (Jacobs et al. 2014).



**Abbildung 6: Kleinzelliges Bronchialkarzinom.** Haferkornförmige Zellen. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 400-fache Vergrößerung.



**Abbildung 7: Azopardi-Effekt.** Nekrotisches Areal eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms mit einem von basophiler DNA umgebenen Blutgefäß (Azopardi-Effekt). Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 400-fache Vergrößerung.

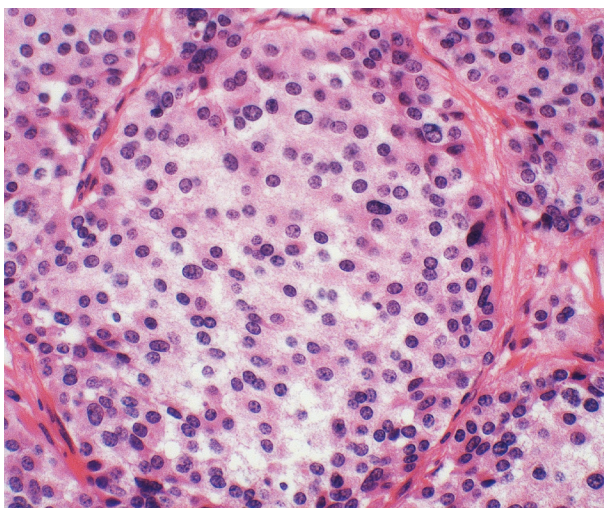
Histologisch sind diese Tumore entdifferenziert. Verschiedenartige kleine Zellen mit haferkornförmiger, runder, ovaler, spindelartiger oder polygonaler Gestalt und stark variierender

Zellgröße sind zu erkennen. Die Zellen sind ungeordnet und durch dünne fibrinartige Septen getrennt (Abbildung 6). Organoides Wachstumsverhalten sowie Trabekel und Pseudorosetten treten in SCLC nicht auf, dafür zeigen sich ausgeprägte Nekrosen. Die dabei freigesetzte basophile DNA der zerstörten Tumorzellkerne haftet an Blutgefäßen und wird bei einer Hämatoxylin-Färbung gut sichtbar. Dieser sogenannte Azopardi-Effekt ist für SCLC typisch und in Abbildung 7 gut zu erkennen.

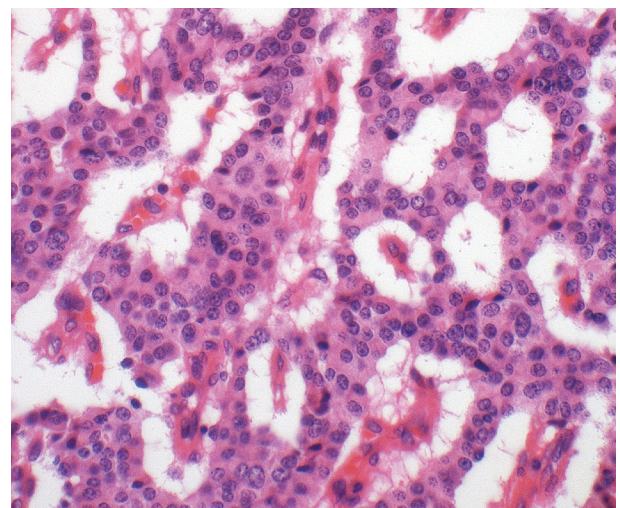
Die einzelnen Tumorzellen haben wenig Zytoplasma. Die Nuclei sind rund und oval vesikulär, mit dicht granuliertem oder auch verschmiertem Chromatin. Sie sind durch eine starke Hyperchromasie gekennzeichnet. Nucleoli sind abwesend oder kaum sichtbar. Die mitotische Aktivität ist mit durchschnittlich 60-80 Mitosen pro 2 mm<sup>2</sup> extrem hoch (Siddiqui 2010, Schnabel und Junker 2015). Nuclear Molding und Quetschartefakte sind typische Erscheinungen (Beasley et al. 2005).

#### 2.1.3.4 Großzellige neuroendokrine Bronchialkarzinome

Mit < 1% aller Lungentumore stellen die LCNEC eine sehr seltene Tumorentität dar, weshalb auch wenige umfassende Studien zu ihnen existieren (Pelosi et al. 2015). In ihrer Aggressivität verhalten sie sich ähnlich den SCLC und weisen ebenfalls hohe Metastasierungsraten und geringe 5- / 10-Jahres-Überlebensraten mit 27% bzw. 9% auf. Die LCNEC werden überwiegend in peripherer Lage diagnostiziert (Gustafsson et al. 2008b). Sie treten vor allem in der siebten Lebensdekade und vierfach häufiger bei Männern als bei Frauen auf (Takei et al. 2002).



**Abbildung 8: Großzelliges neuroendokrines Bronchialkarzinom 1.** Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 400-fache Vergrößerung.



**Abbildung 9: Großzelliges neuroendokrines Bronchialkarzinom 2.** Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 400-fache Vergrößerung.

Wie der Name bereits aussagt, werden mikroskopisch besonders große Tumorzellen (dreimal größer als die Zellen der SCLC) in den LCNEC beschrieben. Sie lassen sich anhand gewisser histologischer Kriterien erkennen: Erstens weisen sie die typischen neuroendokrinen morphologischen Eigenschaften mit organoide, rosettenartigem, trabekulärem oder palisadenartigem Wachstumsverhalten auf (Abbildung 8 und 9). Zweitens zeigen sie mehr als 11 Mitosen pro 2 mm<sup>2</sup>. Ausgeprägte nekrotische Areale mit Quetschartefakten und vereinzelt freien Zellkernen, die den Tumor durchziehen, sind das dritte Charakteristikum. Die Nucleoli sind fast immer sichtbar und Nuclear Molding wird teilweise beschrieben (Siddiqui 2010, Tokuyasu et al. 2011, Schnabel und Junker 2015).

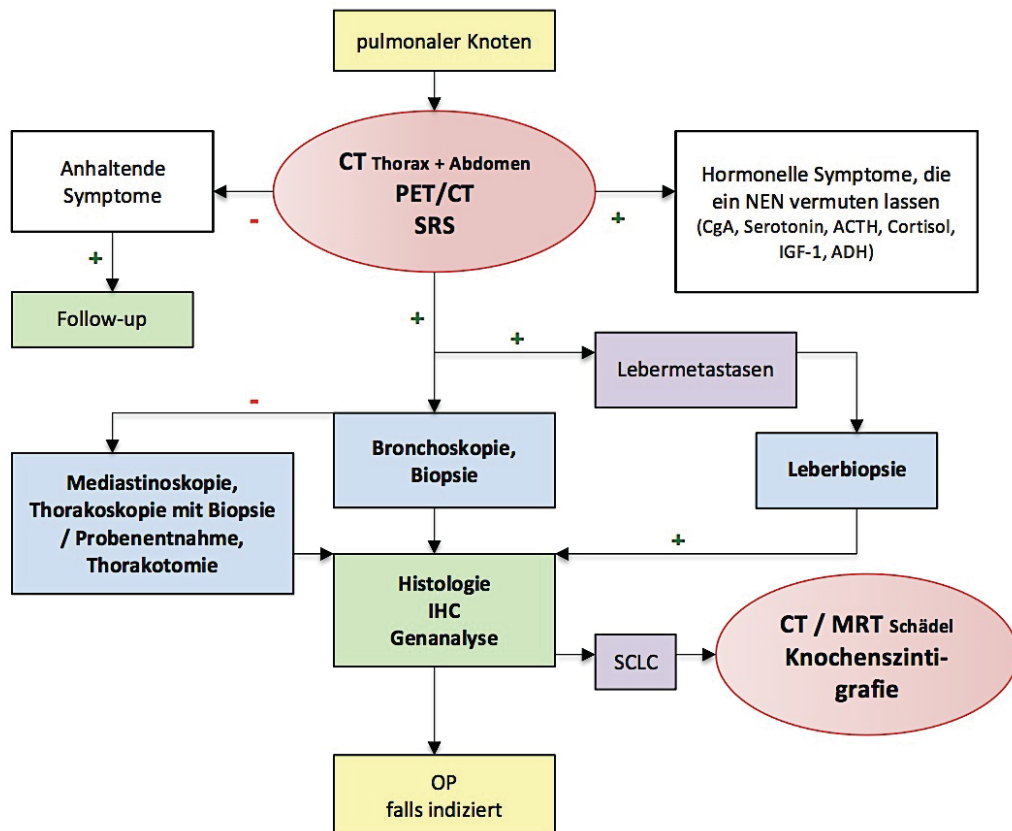
#### 2.1.4 Diagnostik

Für die Diagnosestellung bronchopulmonaler neuroendokriner Tumore ist die Unterscheidung in die verschiedenen Tumorentitäten und das Tumorstaging relevant, da so die korrekte Aussage zur Prognose und die richtigen Maßnahmen zur Therapie getroffen werden können. Es eignet sich die Kombination eines Übersichtsverfahrens mit einer genauen Schnittbildgebung (Bertino et al. 2009). Die Abbildung 10 zeigt den diagnostischen Algorithmus bei BP-NEN: Wird ein pulmonaler Knoten festgestellt / vermutet, stellt man zunächst das Ausmaß der Erkrankung mittels bildgebender Übersichtsverfahren dar. Zu den am häufigsten angewendeten Verfahren zählen hierbei die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT), die Somatostatinrezeptor-Szintigrafie (SRS) und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) (Feelders et al. 2012). Weist der Patient hormonelle Symptome auf, die einen NEN vermuten lassen, erfolgt daraufhin oder bereits im Vorfeld eine laborchemische Diagnostik auf Tumormarker anhand von Blut- / Urinproben. Der wichtigste Biomarker ist dabei das Chromogranin A (CgA), das in etwa 75% der AC und TC sowie in etwa 60% der SCLC im Plasma nachgewiesen werden kann und eine Nachweis-Sensitivität und -Spezifität von 70% bis 100% aufweist (Gustafsson et al. 2008b, Phan et al. 2010, Siddiqui 2010). Die Erfassung der Neuronenspezifischen Enolase (NSE) in BP-NEN wird kontrovers diskutiert (Seregini et al. 2001, Taupenot et al. 2003, Hörsch et al. 2012, Braga et al. 2013, Schnabel und Junker 2015). Ein positiver Nachweis der 5-Hydroxyindolessigsäure, als Abbauprodukt des Serotonins, im Urin weist auf ein Karzinoid-Syndrom hin. Weitere mögliche Biomarker bei funktionellen Tumoren können z.B. das Adrenocorticotropin (ACTH), Cortisol, Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) und der Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) sein (Phan et al. 2010, Oberg et al. 2012, Caplin et al. 2015).

Bei positiven Befunden werden invasive oder minimalinvasive Eingriffe (fiberoptische Bronchoskopie mit bronchialer oder transbronchialer Biopsie bzw. CT-geführte percutane transthorakale Feinnadelbiopsie) durchgeführt, um Proben für die histopathologische Verifizierung zu



gewinnen (Morandi et al. 2006, Galvan et al. 2010, Phan et al. 2010, Hörsch et al. 2012). Für das Grading werden die Mitoserate und das Ausmaß an Nekrosen bestimmt. Aufgrund der hohen Variabilität der zytologischen Eigenschaften sollten diese Tumore, wenn möglich, operativ entfernt und daraufhin genauer histologisch untersucht werden (Arrigoni et al. 1972). Immunhistochemisch werden hierfür Marker wie CgA, Synaptophysin, Somatostatinrezeptoren, Thyroid-Transkriptionsfaktor 1 oder CD56 betrachtet (Travis 2010, Feelders et al. 2012, Hörsch et al. 2012).



**Abbildung 10: Diagnostischer Algorithmus bei BP-NEN.**

PET/CT – Computertomographie / Positronen-Emissions-Tomographie, SRS – Somatostatinrezeptor-Szintigrafie, IHC – Immunhistochemie, CgA – Chromogranin A, ACTH – Adrenocorticotropin, IGF-1 – Insulin-like Growth Factor 1, ADH – Antidiuretisches Hormon, SCLC – Kleinzelliges Bronchialkarzinom, OP – Operation. Modifiziert nach Gustafsson et al. (2008b).

Daraufhin wird das weitere Vorgehen bestimmt, was sich je nach Ausmaß der Erkrankung unterscheidet (Gustafsson et al. 2008b, Phan et al. 2010, Caplin et al. 2015).

Zu erwähnen ist, dass bildgebende Verfahren nicht nur der initialen Bewertung einer Primärerkrankung (Identifikation, Staging, Therapieplanung), sondern auch beim Follow-up (Restaging nach erfolgter Resektion, Überwachung stabiler Phasen, Responsebewertung auf eine therapeutische Maßnahme) eingesetzt werden (Laurent et al. 2006, Gustafsson et al. 2008b, Bertino et al. 2009, Phan et al. 2010, Baum und Kulkarni 2012, Feelders et al. 2012, Caplin et al. 2015).

### 2.1.5 Grading und Staging

Das Grading thorakaler NEN basiert derzeit auf der Ermittlung der Proliferationsaktivität eines Tumors. Gemäß den aktuellen Kriterien der WHO und der International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) werden dabei die Mitoserate pro 10 HPF bzw. 2 mm<sup>2</sup> sowie das Ausmaß an Nekrosen im histologischen Präparat ermittelt (Phan et al. 2010). Im Gegensatz zu den GEP-NEN, bei welchen der nukleäre Marker Ki-67 für das Grading von NET G1, G2 und NEC G3 mittlerweile etabliert ist, werden sein Einsatz sowie die potentiellen Cut-off-Werte in BP-NEN zur Zeit kontrovers diskutiert (Campos et al. 2013, Pelosi et al. 2014a, Rindi et al. 2014). In der neuen WHO-Klassifikation von 2015 sind Ki-67-Richtwerte genannt, welche in Tabelle 1 abgebildet sind (Schnabel und Junker 2015).

**Tabelle 1: Grading von Lungen- und Thymus-NEN gemäß der WHO / IASLC-Kriterien im Vergleich zur Einteilung des Gradings anhand des Proliferationsmarkers Ki-67 in gastrointestinalen NEN.**

Grad	NET G1 – niedrig	NET G2 – mäßig	NEC G3 – hoch
<b>WHO- / IASLC-Kriterien für Lungen- und Thymus-NEN</b>	< 2 Mitosen / 10 HPF und keine Nekrose	2-10 Mitosen / 10 HPF und punkuelle Nekrose	> 10 Mitosen / 10 HPF und Nekrose
<b>Ki-67 für GEP-NEN</b>	≤ 2%	3-20%	> 20%
<b>Ki-67-Richtwerte für BP-NEN – WHO-Klassifikation (2015)</b>	< 5%	< 20%	LCNEC: 40-80% SCLC: 50-100%

Modifiziert nach Siddiqui (2010), Campos et al. (2013), Schnabel und Junker (2015). Legende: NET – Neuroendokriner Tumor; NEC – Neuroendokrines Karzinom; G – Grad; HPF – High-power Field; WHO – World Health Organization, IASLC – International Association for the Study of Lung Cancer

Obwohl es nicht allgemein anerkannt ist, wird das Staging von NEN aus den ermittelten Daten der Diagnostik nach der aktuellen 7. Edition der TNM-Klassifikation der AJCC eingestuft (Hörsch et al. 2012). Die TNM-klassifizierten Tumore können wiederum nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) verschiedenen Tumorstadien (Okkultes Karzinom, 0, IA-IV) zugeordnet werden (Phan et al. 2010, Caplin et al. 2015).

Kleinzellige Bronchialkarzinome werden zusätzlich gemäß der IASLC in *limited disease* und *extensive disease* eingeteilt. Bei dem Stadium *limited disease* ist der Tumor auf einen Hemithorax mit regionalen Lymphknotenmetastasen (hiläre, ipsilaterale und kontralaterale mediastinale Lymphknotenmetastasen sowie ipsilaterale und kontralaterale supraklavikuläre Lymphknotenmetastasen) begrenzt. Alles darüber hinaus wird dem Stadium *extensive disease* zugeordnet (Stahel 1991, Gustafsson et al. 2008b).



### 2.1.6 Therapie

Das therapeutische Vorgehen bei einer BP-NEN-Erkrankung ist an das Ausmaß und die Eigenschaften des Tumors sowie an den Allgemeinzustand des Patienten anzupassen. Obwohl noch nach der optimalen Therapiemöglichkeit gesucht wird, existiert eine Reihe evidenzbasierter Verfahren, welche von der chirurgischen Therapie über die Chemo- und Strahlentherapie bis zur Behandlung mit Peptidhormon-Analoga reicht.

Die einzige kurative Therapieoption für BP-Karzinome ist die komplette chirurgische Tumor-Resektion mit dem Versuch, so viel gesundes Lungengewebe wie möglich zu erhalten (Phan et al. 2010, Sayeg et al. 2014). Weil die kleinen Primärtumore frühzeitig lymphogen metastasieren, sollte parallel eine Lymphadenektomie durchgeführt werden (Gustafsson et al. 2008b, Bertino et al. 2009, Phan et al. 2010, Hörsch et al. 2012).

Bei SCLC und LCNEC sind chirurgische Eingriffe aufgrund des infiltrierenden Wachstumsverhaltens und der starken Metastasierungen kritisch zu bewerten. Nur in niedrigen Tumorstadien (T1-2, N0) kann ein therapeutischer Nutzen erzielt werden (Takenaka et al. 2015). Bei fortgeschrittener, nicht resezierbarer oder bereits stark metastasierter Erkrankung sind Chemotherapie und Radiotherapie indiziert, welche besonders in Kombination einen Benefit zeigen (Bertino et al. 2009). In einigen Fällen können davon auch AC-Patienten profitieren (Gustafsson et al. 2008b, Swarts et al. 2012). Dabei haben sich Etoposid und Cisplatin als Kombinationstherapie bei SCLC gut bewährt (Gustafsson et al. 2008b). In der Remissionsphase eines SCLC erweist sich eine kraniale Bestrahlung, wegen potentieller Hirnmetastasen, als prognostisch sinnvoll (Kaplan et al. 2003, Detterbeck 2010, Schnabel und Junker 2015).

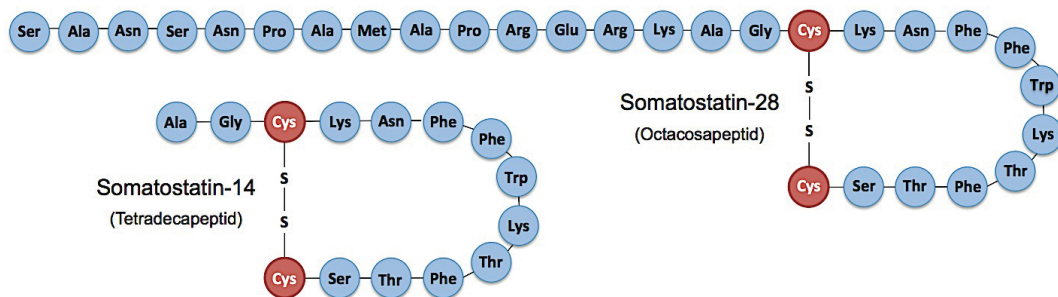
Zur Behandlung einer tumorbedingten hormonellen Hypersekretion kann eine Biotherapie mit Interferonen (IFN- $\alpha$ -2a, IFN- $\alpha$ -2b) und Somatostatin-Analoga (SSA) erfolgen (Plöckinger und Wiedenmann 2007, Gustafsson et al. 2008b, Phan et al. 2010, Swarts et al. 2012, Pavel et al. 2013). Letztere stellen aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofils in der Depotformulierung das Mittel der Wahl bei der Symptom-Kontrolle von Patienten mit paraneoplastischem Syndrom dar (Plöckinger und Wiedenmann 2007, Phan et al. 2010, Pavel et al. 2013). Im Vergleich zum Placebo wurden zusätzlich antiproliferative Effekte mit einer verlängerten progressionsfreien Überlebenszeit von 14 versus 6 Monaten beobachtet (Rubin et al. 1999).

Darüberhinaus kann eine PRRT (Peptidrezeptor-vermittelte Radionuklidtherapie) mit Radionuklid-gekoppelten SSA erfolgen. Die derzeit noch lückenhafte Studienlage empfiehlt ihren Einsatz, wenn andere medizinische Interventionen gescheitert sind (Baum et al. 2012, Bergsland 2013, Toumpanakis und Caplin 2013). Diverse klinische Studien belegen, dass die PRRT die neue zielgerichtete Therapie mit dem größten Potential in NEN darstellt (Baum et al. 2012, Pavel et al. 2013). Auch wenn die NETTER-1-Studie erstmals als prospektive, randomisierte Studie ihren therapeutischen Nutzen an Ileum-NEN-Patienten zeigen konnte, werden hierfür (v.a. auch in BP-NEN) mehr prospektive Studien benötigt (Halperin et al. 2016).

## 2.2 Somatostatinrezeptoren

### 2.2.1 Somatostatin

Somatostatin (SST) ist ein natürlich vorkommendes cyclisches Neuropeptid mit vielen regulatorischen Funktionen. Es kommt in zwei biologisch aktiven Formen vor, welche durch ein einzelnes Gen auf Chromosom 3q27.3 codiert und in ein Prohormon translatiert werden (Brazeau et al. 1973, Pradayrol et al. 1980, Naylor et al. 1983, Zabel et al. 1983, Olias et al. 2004). Das gebildete Präkursor-Protein wird durch posttranslationale Modifikationen auf dem Weg vom rauen Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat in die zwei Isoformen Somatostatin-14 und Somatostatin-28 gespalten (Offermanns 2004, Kleine und Rossmanith 2010). Diese werden unter Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen zu einem zyklischen Molekül (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Aminosäuresequenz der Neuropeptide Somatostatin-14 und -28.**

Modifiziert nach Olias et al. (2004), Kleine und Rossmanith (2010).

Nach der Produktion wird SST in sekretorischen Vesikeln in den jeweiligen Zellen gespeichert. Als Trigger zur Freisetzung fungieren bestimmte Nährstoffe, Ionen, Neuropeptide, Neurotransmitter, klassische Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine.

Somatostatin-produzierende Zellen treten zahlreich im Zentralen Nervensystem, im Peripheren Nervensystem sowie im Plexus Myentericus und Plexus Submucosus des gastroenteralen Nervensystems als Neurone mit multiplen Verzweigungen auf. Im Gehirn sind v.a. Hypophyse, Amygdala oder Cerebellum bedeutende SST-Produzenten. In mehreren großen peripheren Organen sowie im Gastrointestinaltrakt selbst bilden sekretorische zytoplasmaarme D-Zellen dieses Polypeptid. Pankreas und Leber, ferner auch Nieren, Nebennieren, Prostata, Plazenta sowie die Schilddrüse weisen exokrine oder endokrine SST-Zellen auf (Patel 1999, Olias et al. 2004). SST wird jedoch auch in kleineren Mengen von Tumorzellen, inflammatorischen und Immunzellen (z.B. Lymphozyten, Makrophagen, Thymusepithelzellen) exprimiert (Patel und Reichlin 1978).

Die Menge der gebildeten SST-Isoformen ist stark gewebeabhängig. Während im Hypothalamus SST-14 und SST-28 im Verhältnis 4:1 erzeugt werden, überwiegt im Gastrointestinaltrakt SST-28 (Kleine und Rossmanith 2010). Beide Peptide haben nur eine sehr kurze Halbwertszeit (HWZ) von 1-2 Minuten (Bruchhausen und Hager 2000).

Die physiologischen Funktionen des SST sind vielfältig und komplex. Seine Wirkungen entfalten sich sowohl neurokrin als Neurotransmitter und -modulator, als auch endokrin als Hormon oder parakrin als Gewebshormon (Doenecke und Karlson 2005). Auf zellulärer Ebene zeigt Somatostatin über verschiedene Angriffspunkte vielfältige, pan-inhibitorische Effekte auf die Zellproliferation, die Sekretion verschiedener Peptidhormone und Enzyme (Hemmung von z.B. Somatotropin, Gastrin, Pepsin, Sekretin, Insulin, Cortisol, TSH), den Tonus der glatten Muskulatur sowie auf die Neurotransmission (Patel et al. 1995).

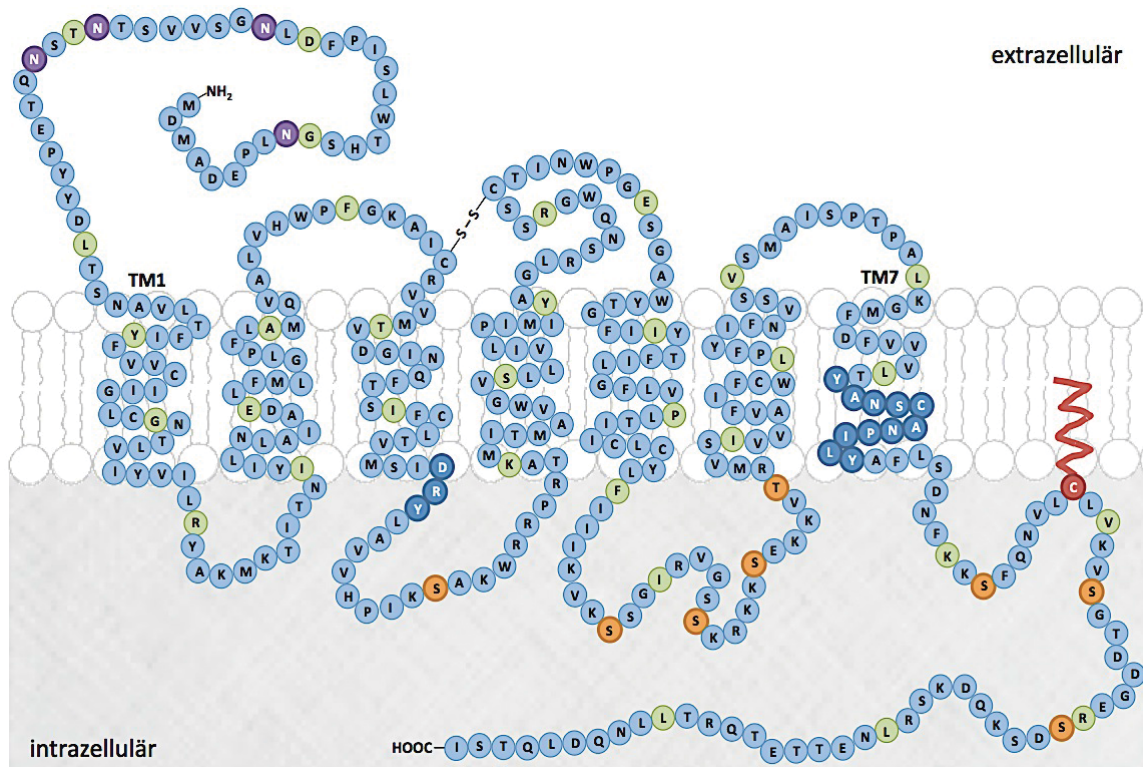
### 2.2.2 Somatostatinrezeptoren

Somatostatin entfaltet seine Wirkung via Bindung an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche nach chronologischer Entdeckung und zum Teil auch hinsichtlich ihrer Sequenzhomologie in sechs Subtypen unterteilt werden: SSTR1, SSTR2A, SSTR2B, SSTR3, SSTR4 und SSTR5 (Bruno et al. 1992, Meyerhof et al. 1992, O'Carroll et al. 1992, Yamada et al. 1992). Sie werden von verschiedenen Genen auf fünf Chromosomen codiert, wobei es sich bei den Subtypen 2A und 2B um Splicevarianten eines einzelnen Gens handelt, die sich an den C-Termini unterscheiden (Taniyama et al. 2005). Der SSTR2A ist dabei die ungespleißte Form, welche im Gegensatz zum SSTR2B im Menschen vorkommt (Fischer et al. 2008, Lupp et al. 2012). Alle SSTR haben eine Sequenzidentität von 39-57% und zeigen Unterschiede bezüglich ihrer biologischen Funktionalität, ihres Vorkommens sowie ihrer intrazellulären Signalkaskaden (Olias et al. 2004).

Die SSTR-Subtypen weisen den typischen heptahelikalen Aufbau von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf (siehe Abbildung 12).

Der extrazelluläre N-Terminus dient der Ligandenbindung und das Carboxy-terminale Ende vermittelt durch Kopplung an G-Proteine intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden. In der siebenten transmembranären Domäne (TM) befindet sich ein hochkonserviertes Motiv der Aminosäuren YANSCANPI/VLY, welches in allen SSTR-Isoformen speziesunabhängig auftritt. Typisch ist auch das feststehende DRY-Motiv an der zytoplasmatischen Seite der Transmembrandomäne drei. Es ist an Signaltransduktionskaskaden beteiligt, ebenso wie die konservierten Erkennungsmotive für die Proteinkinase A, Proteinkinase C und Calmodulin-II-Kinase, welche sich intrazellulär am C-Terminus sowie an der zweiten und der dritten Schleife befinden. N-terminal sowie an der zweiten extrazellulären Schleife sind Subtypen-abhängig ein bis vier Glykosylierungsstellen vorhanden. Ein konservierter Cysteinrest an der TM sieben der

SSTR1, SSTR2, SSTR4 und SSTR5 deutet auf eine Palmitoylierungsstelle hin. Der SSTR3, bei welchem diese Stelle fehlt, zeigt dafür einen wesentlich längeren C-Terminus als die anderen vier Subtypen (Reisine und Bell 1995, Patel 1999, Olias et al. 2004, Kokkola et al. 2011).



**Abbildung 12: Aufbau von Somatostatinrezeptoren am Beispiel des SSTR2A.** G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bestehen aus 7 Transmembran-Alpha-Helices (TM), mit dem N-Terminus auf der extrazellulären und dem C-Terminus auf der intrazellulären Seite. Die grün markierten Aminosäuren entsprechen jeder zehnten Aminosäure. In Violett sind die N-terminalen Glykosylierungsstellen des SSTR2A und in Orange die Phosphorylierungsstellen dargestellt. Das rot abgebildete Cystein entspricht der Palmitoylierungsstelle des SSTR2A. In Dunkelblau sind die zwischen den verschiedenen SSTR konservierten Aminosäuren aufgezeigt (modifiziert nach Weckbecker et al. (2003), Csaba et al. (2012)).

Ähnlich dem SST kommen die Rezeptoren in unterschiedlichen Dichten und Mustern nahezu im gesamten Körper verteilt vor: Physiologischerweise findet man sie im Gehirn, vor allem im Hypophysenvorderlappen, im Gastrointestinaltrakt, in den Pankreas-Inselzellen, in den Nieren, in der Nebennierenrinde, in der Placenta oder in der Leber (Reubi et al. 2001, Offermanns 2004, Lupp et al. 2011, Unger et al. 2012). Das Vorkommen verschiedener Subtypen in Lymphozyten deutet auf Wirkungen im Immunsystem hin (Tsutsumi et al. 1997, Talme et al. 2001, Dalm et al. 2003). Auch in Endothelzellen werden SSTR, v.a. der SSTR2A, nachgewiesen (Taniyama et al. 2005).

Auf zellulärer Ebene konnte festgestellt werden, dass der SSTR2A hauptsächlich membranständig vorliegt. Die SSTR 1, 3 und 5 treten membranständig und zytoplasmatisch auf, wohingegen sich der SSTR4 überwiegend im Zytoplasma nachgewiesen wurde (Reubi et al. 1998, Hofland et al. 1999, Kulaksiz et al. 2002, Fischer et al. 2008, Lupp et al. 2011, Lupp et al. 2012, Lupp et al. 2013).

## **2.2.3 Klinische Relevanz von Somatostatinrezeptoren**

Pathophysiologisch konnte die Expression aller SSTR in der Mehrheit verschiedener Tumorarten identifiziert werden, wodurch sich ein therapeutischer Ansatzpunkt in der Tumorbehandlung bietet. Es findet sich mindestens ein Subtyp u.a. in Tumoren der Hypophyse, bei Karzinoiden, Gastrinomen, Insulinomen, Glucagonomen, Phäochromozytomen, Brust-, Nieren- und Prostatakarzinomen, Paragangliomen, Meningeomen oder Gliomen. Der SSTR2A, gefolgt vom SSTR1 wurden dabei am häufigsten dokumentiert (Kimura et al. 1999, Patel 1999, Kulaksiz et al. 2002, Offermanns 2004). Somit wird eine stratifizierte Diagnostik mittels Somatostatinrezeptor-Szintigrafie bzw. einer SSTR-basierten PET/CT möglich und schließlich kann daraus eine adaptierte pharmakologische Therapie mit SSA sowie, in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien, eine Peptidrezeptor-vermittelte Radionuklidtherapie erfolgen.

### **2.2.3.1 Synthetische Somatostatin-Analoga**

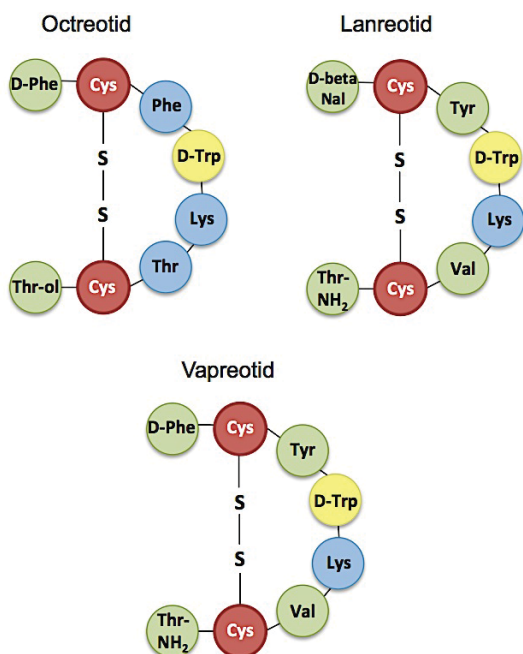
Um die inhibitorischen Effekte des SST zur Therapie paraneoplastischer Syndrome von SSTR-überexprimierenden Tumoren nutzen zu können, wurden synthetische Somatostatin-Analoga (SSA) entwickelt, welche eine deutlich längere HWZ gegenüber dem SST zeigen.

Bereits 1980 wurde hier das Octapeptid Octreotid (Sandostatin®) eingeführt, bei welchem die entscheidende Bindungsstelle von SST an die SSTR (Aminosäurefolge Phe 7 – Trp 8 – Lys 9 – Thr 10 in Form einer  $\beta$ -Schleife) erhalten blieb, das L-Tryptophan jedoch gegen ein D-Tryptophan ersetzt wurde, um die metabolische Stabilität und somit die HWZ auf 2 h zu erhöhen (De Martino et al. 2010). Kurze Zeit darauf folgten die Analogpräparate Lanreotid (Somatuline®) und Vapreotid (Sanvar®). Diese drei Peptidhormonanaloga werden als klassische SSA bezeichnet und zeigen eine hohe Bindungsaffinität zum SSTR2A sowie eine mittlere zu SSTR3 und SSTR5 (Kulaksiz et al. 2002, Pawlikowski und Melen-Mucha 2004, Plöckinger und Wiedenmann 2007). Sie sind v.a. in Depot-Formulierungen zur Therapie endokrin-aktiver Tumoren des Gastrointestinaltraktes, zur Symptomreduktion einer Akromegalie, zur Prophylaxe von postoperativen pankreatischen Komplikationen nach Pankreaschirurgie (Octreotid, Lanreotid) sowie bei gastroduodenalen Blutungen (Vapreotid) zugelassen (Olias et al. 2004,

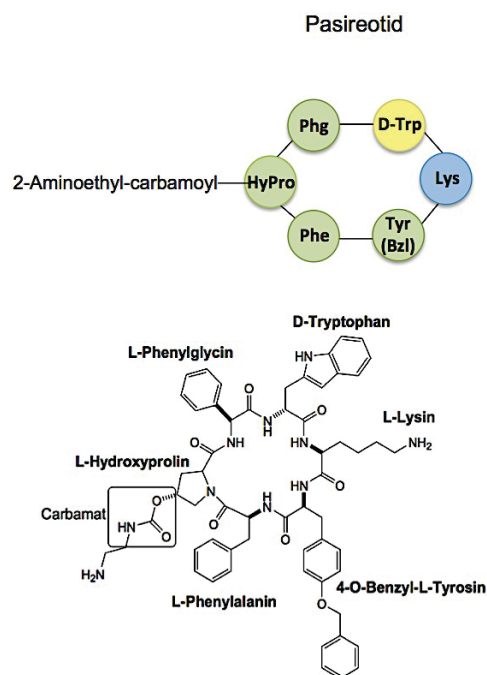


Pawlikowski und Melen-Mucha 2004, Ben-Shlomo und Melmed 2010, De Martino et al. 2010, Graefe et al. 2011).

### Klassische Somatostatin-Analoga



### Pan-Somatostatin-Analoga



SSTR	SST-14	SST-28	Octreotid	Lanreotid	Pasireotid
SSTR1	0,93 ± 0,12	1,05 ± 0,95	280,00 ± 80,00	180,00 ± 20,00	9,30 ± 0,10
SSTR2	0,15 ± 0,02	2,15 ± 1,95	0,38 ± 0,08	0,54 ± 0,08	1,00 ± 0,10
SSTR3	0,56 ± 0,17	3,20 ± 2,90	7,10 ± 1,40	14,00 ± 9,00	1,50 ± 0,30
SSTR4	1,40 ± 0,40	4,10 ± 3,80	> 1000	230,00 ± 40,00	> 100
SSTR5	0,29 ± 0,04	0,18 ± 0,12	6,30 ± 1,00	17,00 ± 5,00	0,16 ± 0,10

**Abbildung 13: Aminosäuresequenz synthetischer Somatostatin-Analoga, Strukturformel des Pasireotids sowie Affinitäten zu den Somatostatinrezeptor-Subtypen im Vergleich zum Somatostatin.**

Blau – ursprünglich dem Somatostatin-14 entsprechende Aminosäuren. Gelb – D-Tryptophan, durch welches wegen der metabolischen Stabilität das ursprüngliche L-Tryptophan ersetzt wurde. Rot – Cysteine, die entsprechend dem Somatostatin-14 an der Disulfidbildung und somit an der Zyklisierung beteiligt sind. Grün – neue substituierte Aminosäuren (Cappuzzo et al. 2005, Felip et al. 2008, Hirsch et al. 2008, Gori et al. 2009, Lee et al. 2010). Alle Angaben in der Tabelle sind Mittelwerte der IC<sub>50</sub>-Werte in nmol/l mit dem Standardfehler. Modifiziert nach Plöckinger und Wiedenmann (2007). Legende: SSTR – Somatostatinrezeptoren, SST – Somatostatin.

Neben den verminderten Symptomen eines paraneoplastischen Syndroms während einer SSA-Therapie konnten darüber hinaus auch Verkleinerungen oder Stagnationen der Tumorgöße sowohl in retrospektiven (Toumpanakis und Caplin 2013), als auch in prospektiven randomisierten Studien (PROMID oder CLARINET (Eriksson et al. 1997, Wymenga et al. 1999, Ricci et al. 2000)) beobachtet werden.

Im Juni 2012 wurde durch die Novartis Pharma GmbH ein neues SSA auf dem Markt eingeführt, welches durch das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen als Sprunginnovation bewertet wurde: Pasireotid hat im Gegensatz zu den klassischen SSA ein breiteres und verbessertes Bindungsspektrum an die verschiedenen SSTR-Subtypen, eine längere systemische HWZ (12 h) sowie deutliche strukturelle Unterschiede (siehe Abbildung 13) (Schmid 2008, Wolin 2012, Toumpanakis und Caplin 2013). Aufgrund seiner ausgeprägten inhibitorischen Effekte auf die Hormonsekretion in Tiermodellen sowie eine verstärkte SSTR-vermittelte Apoptose und Antiangiogenese in Karzinoiden werden klinische Vorteile gegenüber Octreotid und anderen SSA erwartet (Schmid 2008). Derzeit ist es zur Therapie des hypophysären Morbus Cushing sowie der Akromegalie zugelassen (Fachinfo Signifor®, Stand März 2015). Indikationserweiterungen sind in klinischer Erprobung (Plöckinger und Wiedenmann 2007, Schmid 2008, Wolin 2012).

#### 2.2.3.2 Somatostatin-Analoga in der Peptidrezeptor-vermittelten Radionuklidtherapie

Mittels Markierung der Analoga mit  $\beta$ -strahlenden Radioisotopen ist es möglich, durch die antiproliferativen Effekte der emittierenden Teilchen bei einem Viertel aller Patienten mit SSTR-Expression sogar Tumorreduktionen um 50% zu erreichen. Bei dieser sogenannten Peptidrezeptor-vermittelten Radionuklidtherapie (PRRT) wird ein Radionuklid über einen Chelator an ein zyklisches Octapeptid gekoppelt, welches an SSTR bindet und über eine anschließende Internalisierung in die jeweilige Zelle aufgenommen wird. Als Radionuklide dienen heute Yttrium ( $^{90}\text{Y}$ ) und Lutetium ( $^{177}\text{Lu}$ ). Ersteres erweist sich mit einer Gewebepenetration von 12 mm als guter  $\beta$ -Strahler (935 keV). Im Gegensatz zum  $^{177}\text{Lu}$  (133 keV), welches sowohl als  $\beta$ -Strahler (2 mm Gewebedurchdringung), als auch als  $\gamma$ -Strahler fungiert, ist die Verwendung von  $^{90}\text{Y}$  für die Bildgebung nicht sinnvoll.

Die gängigsten Chelatoren sind DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) oder DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure), wobei am häufigsten die Peptid-Chelatoren [DOTA<sup>0</sup>, Tyr<sup>3</sup>]-Octreotid (DOTATOC) und [DOTA<sup>0</sup>, Tyr<sup>3</sup>]-Octreotate (DOTATATE) in Gebrauch sind. Weitere Komplexe sind [DOTA<sup>0</sup>-1-Nal<sup>3</sup>]-Octreotid (DOTANOC),  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Lanreotid (Lanreotid) und DTPA-Octreotid (Bergsma et al. 2012). Die klinisch am besten erprobten Somatostatin-Analoga sind  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE, wobei DOTATATE eine 9-fach höhere Affinität zum SSTR2A aufweist als DOTATOC (Reubi et al. 2000b, Plöckinger und Wiedenmann 2007).

Die PRRT zeigt ihre Vorzüge in der Therapie inoperabler metastasierter NEN. Durch ihren zielgerichteten Therapieansatz ist sie durch wenige Nebenwirkungen, wie Myelosuppression und eine Nephrotoxizität, gekennzeichnet. Letztere kann über die präventive Gabe von positiv geladenen Molekülen, wie den Aminosäuren L-Lysin und L-Arginin, die eine tubuläre Rückresorption der Radiopeptide verhindern, vermindert werden (van Essen et al. 2007).

### 2.2.3.3 Radionuklid-markierte Somatostatin-Analoga in der bildgebenden Diagnostik

Sowohl in der PET, als auch in der SRS werden Radionuklid-markierte SSA eingesetzt. Der Aufbau besteht auch hier aus einem Radionuklid, einem Chelator und einem zyklischen Octapeptid. Bei den Radionukliden werden in der Diagnostik jedoch Gamma-Strahler verwendet, welche sich zur Ganzkörper-Lokalisationsdetektion mittels Gamma-Kamera eignen. Gallium ( $^{68}\text{Ga}$ )-, Kupfer ( $^{64}\text{Cu}$ )-, Indium ( $^{111}\text{In}$ )- und Technetium ( $^{99}\text{Tc}$ )-markierte SSA haben sich in der Diagnostik bewährt (Campana et al. 2013).

Bei der SRS wird eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 83% beschrieben (de Herder et al. 2006).  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DPhe<sup>1</sup>-Octreotid ( $^{111}\text{In}$ -Pentetreotid) ist derzeit das Radiopharmazeutikum der Wahl. Bei BP-NEN sollten  $^{99}\text{Tc}$ -markierte Analoga Verwendung finden und die SRS auf jeden Fall mit einer Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) (24 Stunden post injectionem) kombiniert werden (Kwekkeboom und Krenning 2002). Nachteile der Methode sind lange Untersuchungszeiten, eine starke Strahlenbelastung der Patienten sowie hohe Kosten.

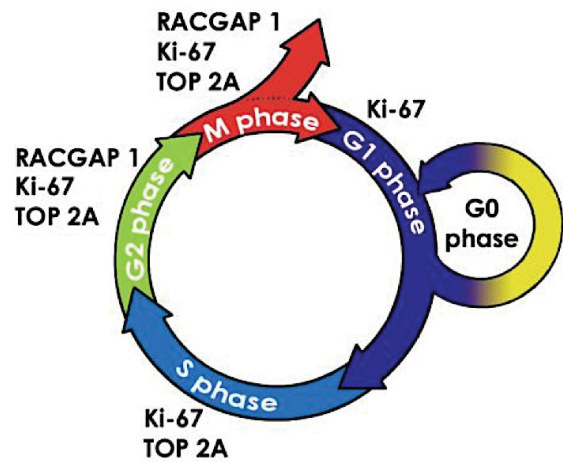
In dieser Hinsicht zeigt sich die PET überlegen, welche vor allem in Kombination mit einer integrierten Mehrschicht-CT sowohl strukturelle (CT) als auch funktionelle (PET) Aussagen zu einem Tumor in einem einzigen Untersuchungsgang liefert. Dieses Verfahren hat eine sehr hohe diagnostische Sensitivität und Spezifität und erzeugt quantitative, reproduzierbare Daten in einer kurzen Untersuchungszeit (60 bis 90 min) mit einer vergleichsweise geringen Strahlenexposition (10 bis 12 mSv) und einem Kostenvorteil gegenüber der SRS (Kowalski et al. 2003). In SCLC hat sich mit einer Sensitivität von 100% die PET mit  $^{18}\text{F}$ Fluorodesoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ FDG-PET), welche den erhöhten Glucoseumsatz von neoplastischem Gewebe ausnutzt, bewährt (Baum und Kulkarni 2012). Aufgrund der geringen Proliferationsraten und metabolischen Aktivität der TC und AC hat sich hier die Kombination mit einem Radionuklid-markierten SSA als günstiger erwiesen. Vor einer PET sollte also zunächst der Proliferationsindex sowie die SSTR-Expression (v.a. SSTR2 und SSTR5) histologisch untersucht werden, um den richtigen Tracer einzusetzen (Kruger et al. 2006, Bertino et al. 2009).

In der SSTR-basierten PET ist  $^{68}\text{Ga}$  ein klinisch sehr bewährter Positronenemitter, welcher über ein Titandioxid-basiertes  $^{68}\text{Ge}$  /  $^{68}\text{Ga}$ -Generatorsystem mit einer HWZ von 288 Tagen vollautomatisiert im klinischen Alltag aufbereitet werden kann (Baum und Kulkarni 2012). Durch Gabriel et al. (2007) konnte gezeigt werden, dass die Genauigkeit eines  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC-PET mit 96% signifikant höher liegt als die von CT-Befunden (75%) und Untersuchungen mittels  $^{111}\text{In}$ -DOTATOC-SPECT (58%) (Zhernosekov et al. 2007). Die  $^{68}\text{Ga}$ -PET detektiert routinemäßig kleinere Läsionen (< 1 cm) als eine CT, MRT, Szintigrafie oder ein Ultraschall (Gabriel et al. 2007). Auch durch Kowalski et al. wird die Überlegenheit der PET gegenüber der Octreotid-Szintigrafie beschrieben. Mit ihr können kleinere Tumore mit geringerer SSTR-Dichte besser detektiert werden (Kowalski et al. 2003, Baum und Kulkarni 2012).



## 2.3 Proliferationsmarker

Ein Proliferationsmarker ist ein Indikator für die Wachstumsfraktion einer gegebenen Zellpopulation. Hierbei muss er zwei Anforderungen erfüllen: 1. das Antigen sollte während des Zellzyklus in allen Zelltypen vorhanden sein und 2. beim Übergang in einen nicht-proliferierenden Zustand der Zelle sollte die Anwesenheit dieses Antigens zügig nachlassen (Scholzen und Gerdes 2000). In der folgenden Arbeit werden die Proliferationsmarker Ki-67, Topoisomerase 2 alpha (TOP2A) und das Rac GTPase-aktivierende Protein 1 (RacGAP1) näher betrachtet (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14: Nachweisbarkeit der ausgewählten Proliferationsmarker während des Zellzyklus.** Ki-67, TOP2A – Topoisomerase 2 alpha, RacGAP1 – Rac GTPase-aktivierendes Protein 1.

### 2.3.1 Ki-67

Das Ki-67 ist ein nukleäres Antigen, welches erstmals durch einen monoklonalen Antikörper definiert wurde, welcher bei der Immunisierung von Mäusen mittels Nuklei der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L428 entstand. Der Name leitet sich dabei einerseits von der Herkunftsstadt Kiel und andererseits von der Nummer 67 des jeweiligen Klons in der 96-Well-Platte ab (Gerdes et al. 1983).

Ki-67 oder auch MKI67 ist ein nukleäres Protein, das vom 30 000 bp und 15 Exons umfassenden MKI67-Gen auf Chromosom 10q26.2 codiert und durch alternatives Splicing in humanem Gewebe in zwei Proteinisoformen (320 und 359 kDa) transkribiert wird (Schluter et al. 1993, Duchrow et al. 1996, Scholzen und Gerdes 2000, Pelosi et al. 2014a). Diese unterscheiden sich durch die An- oder Abwesenheit von Exon 7 (Schluter et al. 1993).

Ki-67 ist in allen Phasen von proliferierenden Zellen (G1-, S-, G2-, M-Phase) vorhanden, aber in ruhenden Zellen (G0-Pase) abwesend (Galvan et al. 2010, Siddiqui 2010). Die Positivität in der G1-Phase hängt vom Proliferationszustand der Zelle ab. Im *Ki-67-stabilen Pathway*, unter optimalen lokalen Wachstumsbedingungen, läuft der Zellzyklus von der Mitose (M-Phase), über die G1A- und G1B-Phase kontinuierlich ab. Der *Ki-67-abfallende Zustand* ist dadurch gekennzeichnet, dass eine Zelle aus der M-Phase direkt in den ruhenden Zustand (G0) übergeht. Durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren können solche Zellen jedoch in den *Ki-67-ansteigenden Pathway* eintreten, indem sie von der G0-Phase über die nicht zum Zellzyklus-

gehörenden Zwischenphasen G1T, G1a und G1b (Ki-67 negativ) wieder in die Ki-67-positive G1B-Phase übergehen und den Zellzyklus weiter durchlaufen (Gerdes et al. 1984, du Manoir et al. 1991). Während der S-Phase steigt der Ki-67-Level über die G2-Phase bis er schließlich in der Metaphase seinen Höhepunkt erreicht. Bereits während der Ana- und Telophase beginnt die Ki-67-Konzentration jedoch wieder abzunehmen (Scholzen und Gerdes 2000).

Während dieser Phasen durchläuft Ki-67 einen komplexen Mechanismus von posttranslationaler Phosphorylierung und Dephosphorylierung. Dadurch ändert sich im Laufe des Zyklus die zelluläre Lokalisation von der Innenseite des Zellkerns, den Nucleoli, der *dense fibrillar components* (DFC) während der Interphase über die perichromosomale Schicht zum Heterochromatin in der Mitosephase (Kill 1996, MacCallum und Hall 2000, Scholzen und Gerdes 2000). Dabei wird das Ki-67-Protein durch eine kontinuierliche Interaktion von Neusynthese und Degradation reguliert (Scholzen und Gerdes 2000). Seine genaue Funktion ist bis dato ungeklärt, es scheint jedoch eine zentrale Rolle im Proliferationszyklus einzunehmen. Eine neuere Studie von Booth et al. (2014) zeigte, dass es als potentielles Scaffold-Protein für die Ausbildung der perichromosomalen Schicht essentiell sein und somit das Verhalten der Chromosomenanordnung während der Mitose steuern könnte (Booth et al. 2014).

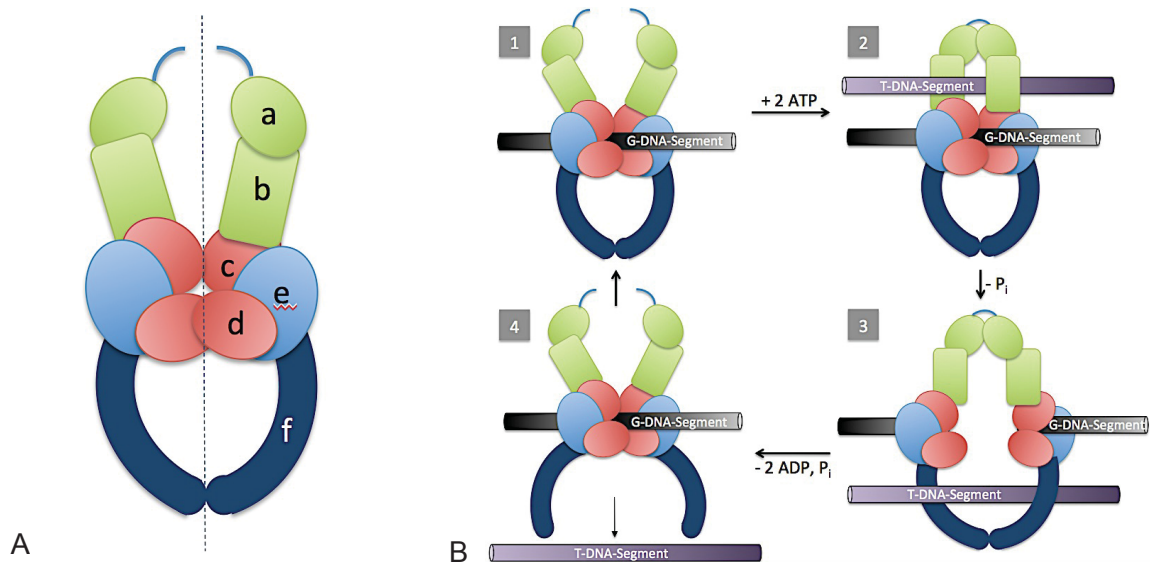
Aufgrund seiner kurzen HWZ von 90 min und dem Fakt, dass das Ki-67 in allen aktiven Phasen des Zellzyklus anwesend ist, eignet es sich besonders gut als Proliferationsmarker zur Darstellung der aktuellen Wachstumsfraktion einer Zellpopulation (Heidebrecht et al. 1996). Daher wird es in der Diagnostik als histopathologischer Marker bei vielen Neoplasien, z.B. Brustkrebs, bereits eingesetzt, um prädiktive Aussagen treffen zu können. Die ersten neuroendokrinen Neoplasien, welche bezüglich des Ki-67 charakterisiert wurden, waren Pankreas-NEN. Hierbei wurde dessen gute prognostische Aussagekraft hervorgehoben und somit der Weg zur routinemäßigen Einführung in die Diagnostik von NEN des Gastrointestinaltraktes geebnet (Martin-Perez et al. 2013, Pelosi et al. 2014a). Schließlich wurde es im Jahre 2010 in das ENETS- / AJCC- / WHO-Gradingssystem von GEP-NEN aufgenommen (siehe Tabelle 1 – Ki-67-abhängiges Grading von GEP-NEN) (van Adrichem et al. 2013, Miller et al. 2014, Pelosi et al. 2014a). Dennoch gibt es immer noch sehr kontroverse Ansichten, ob das Ki-67 gegenüber der Mitosenzählung wirklich Vorteile bietet und ob dessen Grenzwerte im Grading verändert werden sollten (Martin-Perez et al. 2013, Pelosi et al. 2014a, Wang et al. 2014). Obwohl bereits einige Studien zur Ki-67-Expression in BP-NEN existieren, ist seine klinische Anwendung und Wertigkeit in dieser Tumorgruppe noch nicht vollständig geklärt (Zheng et al. 2013, Pelosi et al. 2014a, Rindi et al. 2014).

### 2.3.2 Topoisomerase 2 alpha

Um die Voraussetzungen für DNA-abhängige Prozesse wie Replikation, Transkription oder Translation zu schaffen, muss die superhelikale, hochspiralisierte Topologie der DNA zunächst entwunden werden (Parker et al. 2014). Hierfür beschrieb Dr. James Wang 1971 das erste Mal eine Gruppe von Enzymen, welche die räumliche 3D-Struktur-Umwandlung durch Strangbrüche der DNA katalysieren, indem sie Veränderungen an den Zucker-Phosphat-Gruppen der Desoxyribonukleinsäuren herbeiführen und als DNA-Topoisomerasen bezeichnet werden (Osheroff 1998). Aufgrund ihrer Spaltungsfähigkeiten unterscheidet man dabei Topoisomerasen vom Typ I, welche Einzelstrangbrüche induzieren, wohingegen die Typ-II-Topoisomerasen Doppelstrangbrüche verursachen (Calderon-Montano et al. 2013).

Zum Typ II gehören die Topoisomerasen 2 alpha (TOP2A) und 2 beta (TOP2B), bei welchen es sich jeweils um Enzym-Homodimere handelt (Bau und Kurz 2014). Obwohl sie von zwei verschiedenen Chromosomen codiert werden, weisen sie eine Sequenzhomologie von 70% auf, sodass von einer Genduplikation ausgegangen wird. Das TOP2A-Gen auf Chromosom 17q21-22 enthält 35 Exons und das der  $\beta$ -Isoform auf Chromosom 3p24 36 Exons (Lang et al. 1998). Somit werden Enzyme mit 1531 Aminosäuren (172 kDa) bzw. 1621 Aminosäuren (180 kDa) codiert (Lang et al. 1998, de Resende et al. 2013).

Jedes Enzym-Monomer besteht aus drei Untereinheiten: Das N-terminale Ende hat eine ATPase-Funktion, die zentrale Domäne dient durch einen aktiven Tyrosinrest als DNA-Bindungsstelle und der C-Terminus weist Isoenzym-spezifische Aufgaben auf (Austin und Marsh 1998). Der exakte Aufbau der Typ-II-Topoisomerasen lässt sich aus Abbildung 15 (A) entnehmen. Hieraus wird auch ersichtlich, wie die katalytische Reaktion der topologischen DNA-Umwandlung stattfindet (B): Die Reaktion beginnt, indem ein doppelsträngiges DNA-Segment, genannt G-Segment (*gate segment*), an die zwei katalytischen Elemente im Zentrum des Topoisomerase-Dimers koppelt. Durch die anschließende Bindung zweier ATP-Moleküle an die ATPase-Domäne der Topoisomerase wird ein zweiter DNA-Doppelstrang, das sogenannte T-Segment (*transfer segment*), eingefasst. Dieser Einschluss des T-Segments, mit der dadurch bedingten Dimerisierung der ATPase-Domäne, führt zur Spaltung und somit zur Öffnung des G-Segments, wodurch das T-Segment durch die Lücke des G-Segments transportiert wird. Dabei wird ADP freigesetzt, was zur Öffnung des Enzymhomodimers führt, welches nun wieder für weitere Spaltungsvorgänge zur Verfügung steht (Schoeffler und Berger 2005, Seol et al. 2013).



**Abbildung 15: Topoisomerase 2 alpha.**

**A** – Genereller Aufbau von Topoisomerasen der Subfamilie 2A. In Grün sind die ATPase-Bindungsdomänen (a – GHKL-Domäne, b – Transducer-Domäne) aufgezeigt, das DNA-Tor (rot) wird durch c – die Toprim-Domäne und d – die 5Y-CAP-Domäne gebildet. An sie knüpft direkt die Tower-Domäne (e) in Hellblau an. In Dunkelblau ist das C-Tor (f) dargestellt.

**B** – Schematische Darstellung des katalytischen Zyklus von Typ-2A-Topoisomerasen. Im ersten Schritt bindet das G-DNA-Segment an das DNA-Tor. Nach ATP-Bindung schließen die ATPase-Bindungsdomänen das T-DNA-Segment im zweiten Schritt ein. Die ATP-Hydrolyse triggert unter Abspaltung von  $P_i$  die Öffnung des DNA-Tors und somit die T-Segment-Passage (dritter Schritt). Im letzten Schritt kann das T-Segment durch die Öffnung des C-Tores entweichen, während das G-Segment wieder verknüpft wird. Durch die Abspaltung der Hydrolyse-Produkte wird das ATP-Tor wieder geöffnet, so dass das Enzym für einen neuen Zyklus bereit ist. Modifiziert nach Schoeffler und Berger (2005).

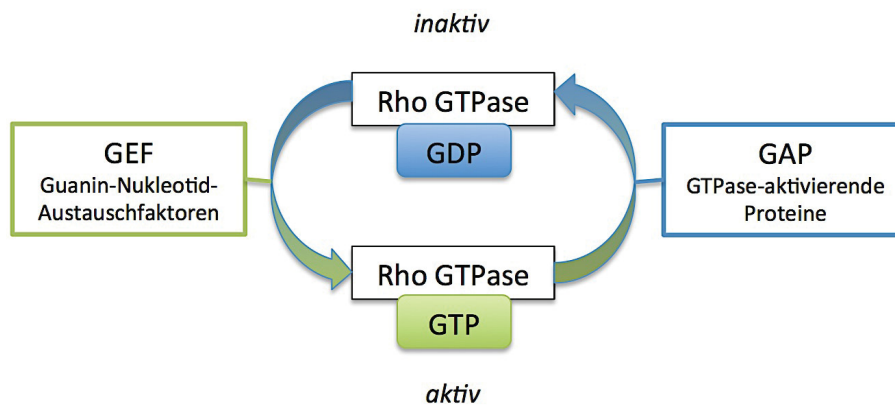
Dieser ATP-abhängige Doppelstrangpassage-Mechanismus führt durch Ausbildung / Auflösung von DNA-Supercoils, Katenation / Dekatenation sowie Knotting / Unknotting von DNA-Doppelsträngen zur räumlichen Umwandlung bzw. Änderung der Torsionsspannung der DNA, um somit wichtige Prozesse zu ermöglichen (Schoeffler und Berger 2005): Die TOP2A spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung und DNA-Replikation, wohingegen die TOP2B vorwiegend der Transkription und der neuronalen Entwicklung dient (Bau und Kurz 2014).

Aufgrund ihrer Überexpression in vielen Malignitäten wurden Topoisomerasen vom Typ II (TOP2) als klinisches Target für eine zytostatische Therapie in der Onkologie relevant. Hierbei unterscheidet man zwischen TOP2-Giften und TOP2-Inhibitoren. Zu den klinisch relevanten Topoisomerase-Giftstoffen zählen die Anthrazykline, welche die oben dargestellte katalytische Reaktion auf der Höhe des Spaltungskomplexes stabilisieren. Somit steigt die Konzentration an gespaltenen DNA-Abschnitten, obwohl zelluläre Prozesse wie Transkription und Replikation ungehindert weiter ablaufen. Die dabei generierten zahlreichen pathologischen Lücken im Genom führen durch ihr mutagenes Potential zum programmierten Zelltod (Burden und

Osheroff 1998). Die TOP2-Inhibitoren stabilisieren das Enzym irreversibel in geschlossener Konformation, sodass die katalytische Reaktion verhindert wird (Austin und Marsh 1998, Burden und Osheroff 1998). Obwohl beide Substanzklassen mit beiden TOP2-Enzymen interagieren, wird die TOP2A als primäres Target beschrieben. Sie zeigt im Vergleich zur TOP2B eine höhere Ansprechbarkeit auf zytotoxische Substanzen sowie eine bevorzugte Affinität zu neusynthetisierter DNA (Burden und Osheroff 1998, Dingemans et al. 1998). Beim Mammakarzinom wurde festgestellt, dass das TOP2A-Gen mit dem HER2-Gen (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Gen), welches in unmittelbarer Nachbarschaft auf dem selben Chromosomenarm liegt, häufig eine Koamplifikation aufweist (Jarvinen et al. 2000). Aus diesem Grund stellt die TOP2A beim Mammakarzinom und darüber hinaus auch beim Ovarialkarzinom zusätzlich zur Nutzung als therapeutische Zielstruktur einen diagnostischen und prognostischen Marker dar (Fountzilas et al. 2012, Yang et al. 2013). In NEN hat sie in dieser Hinsicht noch keine Bedeutung.

### 2.3.3 Rac GTPase-aktivierendes Protein 1

RhoGTPasen (*Ras Homologue*) gehören zur Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen und umfassen eine Familie von insgesamt 20 intrazellulären Signalmolekülen, welche aufgrund ihrer Sequenzhomologie acht Subgruppen zugeordnet werden. Unter ihnen sind die Subgruppen Rho (*Ras Homologous*), Rac (*Ras-related C3*) und Cdc42 (*Cell Division Cycle 42*) am besten charakterisiert (Narumiya und Yasuda 2006, Heasman und Ridley 2008, Li et al. 2010, Azzarelli et al. 2014). Sie regulieren durch den Einfluss extrazellulärer Stimuli zahlreiche essentielle zelluläre Prozesse wie die Morphogenese, die Zellmigration, die neuronale Entwicklung, die Zellteilung oder die Adhäsion, und führen somit zu adaptativen zellmorphologischen Änderungen (De Filippis et al. 2014). Fast alle RhoGTPasen unterliegen dabei einem Zyklus von der Guanosintriphosphat (GTP)-gebundenen aktiven im Wechsel mit der Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen inaktiven Form, welcher durch drei Arten von Proteinen reguliert wird: *Guanin-nucleotide-exchange Factors* (GEFs), *GTPase-activating Proteins* (GAPs) und *Guanin-nucleotide-dissociation Inhibitors* (GDIs). GEFs katalysieren dabei den Austausch von GDP zu GTP, wohingegen GAPs intrinsische GTP-abhängige Prozesse aktivieren und dabei die GTP-gebundene aktive in die GDP-gebundene nicht aktive Form überführen (siehe Abbildung 16) (Kitamura et al. 2001, Li et al. 2010, Bastos et al. 2012, Jacquemet et al. 2013).



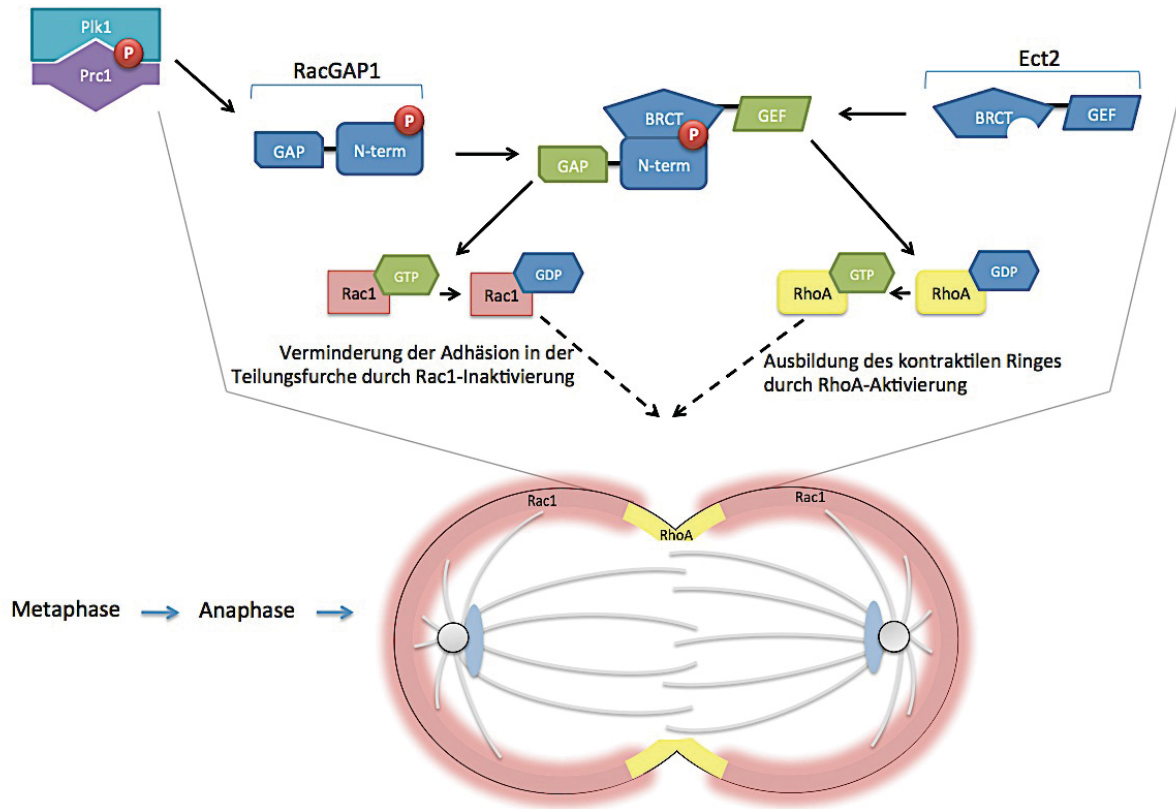
**Abbildung 16: Funktionsprinzip von RhoGTPasen.**

GAP – GTPase-activating Protein, GEF – Guanin-nucleotide-exchange Factor.

Das Rac GTPase-aktivierende Protein 1 (RacGAP1), oder auch MgcRacGAP, Cyk-4 oder HsCyk-4 genannt, wurde 1998 erstmals in männlichen Keimzellen durch Touré beschrieben und ist auf Chromosom 12q13 lokalisiert (Toué et al. 1998, Liang et al. 2013). 29 Splicevarianten sind bekannt. RacGAP1 reguliert die Aktivität der RhoGTPasen Rac1 sowie Cdc42 und bewirkt eine indirekte Aktivierung von RhoA. Somit hat es u.a. einen Einfluss auf die Zellmorphologie, -motilität, -chemotaxis, -polarität sowie die Zytokinese (Li et al. 2010, Saigusa et al. 2015). O'Brien et al. beschrieben weiterhin, dass RacGAP1 für die Differenzierung von Embryonen sowie von hämatopoetischen Stammzellen bedeutend ist (O'Brien et al. 2010).

Eine zentrale Rolle nimmt es dadurch ein, dass ein RacGAP1-Dimer gemeinsam mit einem Dimer des Kinesin-ähnlichen Proteins MKLP1 / ZEN-4 / KIF23 den heterotetrameren Zentralspindlin-Komplex ausformt (Petronczki et al. 2007, Burkard et al. 2009, Wolfe et al. 2009, Li et al. 2010, Bastos et al. 2012, Jacquemet et al. 2013, Ke et al. 2013). Dieser ist ein zentraler Bestandteil der Zytokinese und bewirkt, dass der RhoA-aktivierende GEF Ect2 in die Äquatorialebene der Zelle rekrutiert und somit RhoA in der kontraktile Furche aktiviert wird. Dadurch kann sich der für die Zytokinese notwendige kontraktile Ring ausbilden (Petronczki et al. 2007, Takaki et al. 2008, Burkard et al. 2009, Wolfe et al. 2009, Li et al. 2010). Weiterhin bewirkt RacGAP1 in dieser Zellregion eine Inaktivierung von Rac1, was zur Folge hat, dass die Zelladhäsion in diesem Bereich reduziert wird und die Zytokinese erfolgreich ablaufen kann (Bastos et al. 2012, Davies und Canman 2012). RacGAP1 fungiert also im Rahmen des Zentralspindlin-Komplexes während der Zytokinese als Anker für die RhoA-Aktivierung und die Rac1-Inaktivierung (siehe Abbildung 17).





**Abbildung 17: Molekularer Mechanismus der Rolle des RacGAP1 während der Zytokinese.**

Dargestellt ist eine sich teilende Zelle während der Ausbildung der Teilungsfurche. In der Anaphase wird die Plk1 durch die Phosphorylierung von Prc1 gebunden und zur Zentralspindel rekrutiert. Dort wird RacGAP1 phosphoryliert, wodurch es die Rho-aktivierende GEF Ect2 über die BRCT-Domäne bindet und zur Zentralspindel in die Äquatorialebene rekrutiert. Die aktivierte GAP inaktiviert daraufhin Rac1 in der Äquatorialebene und somit wird die Zelladhäsion in diesem Bereich herabgesetzt. Gleichzeitig ermöglicht die GEF-bedingte Aktivierung von RhoA die Ausbildung des kontraktilen Ringes. Die Zytokinese kann nun erfolgreich ablaufen. Plk1 – Polo-like Kinase 1, Prc1 – Protein Regulator of Cytokinesis 1, RacGAP1 – Rac GTPase-aktivierendes Protein 1, GAP – GTPase-aktivierendes Protein, Ect2 – Epithelial Cell Transforming 2, BRCT – BRCA1C-terminale Domäne, GEF – Guanin-nucleotide-exchange Factor, Rac1 – Ras-related C3 Botulinumtoxin Substrat 1, RhoA – Ras-homologes Genfamilienmitglied A, GTP – Guanosintriphosphat, GDP – Guanosindiphosphat. Modifiziert nach Petronczki et al. (2007), Takaki et al. (2008), Li et al. (2010), Bastos et al. (2012).

Im Jahr 2012 stellten Ratheesh et al. eine weitere, sogar extramitotische Funktion des Zentralspindlin-Komplexes fest. Dabei reguliert RacGAP1 die Integrität von Adhäsionsverbindungen (*Adherens Junctions*) in der Zonula adhaerens. Durch den Zentralspindlin-Komplex wird Ect2 in die Zonula adhaerens rekrutiert, dort über  $\alpha$ -Catenin verankert, wodurch RhoA lokal begrenzt aktiviert wird und somit die Integrität der Adhäsionsverbindungen aufrecht erhält. Durch das RacGAP1 des Zentralspindlin-Komplexes wird in der Zonula adhaerens zusätzlich Rac inaktiviert, was die Rekrutierung der RhoA-GAP p190BRhoGAP blockiert. Somit kann RhoA durch Ect2 aktiviert bleiben (Ratheesh et al. 2012).

RacGAP1 hat darüber hinaus auch Einflüsse auf die Zellmigration. Durch bestimmte Proteine in der extrazellulären Matrix (EZM) werden mit der Zellmigration assoziierte Integrinrezeptoren aktiviert, bei welchen die Haupteffektoren des Integrin-Signalings Rezeptortyrosinkinasen und

RhoGTPasen darstellen. So konnten Jacquemet et al. (2013) bei Fibronektin-reicher EZM eine Aktivierung des  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin-Rezeptors und somit von PKB / Akt in Pseudopodien von Zellen nachweisen, wobei letzteres RacGAP1 phosphoryliert (ohne den Zentralspindlin-Komplex zu beeinflussen). Dadurch wird RacGAP1 zum IQGAP1-Komplex zu den Spitzen von Pseudopodien rekrutiert und führt dort zur lokalen Rac-Unterdrückung und RhoA-Aktivierung. Dies wiederum bewirkt eine Verlängerung der Plasmamembranausstülpungen und schließlich eine invasive Migration von Zellen in eine Fibronektin-reiche EZM (Jacquemet et al. 2013). Weiterhin wird postuliert, dass RacGAP1 über die endothelial-mesenchymale Transition die Migration / Invasion von Tumorzellen begünstigt (Saigusa et al. 2015).

In Zelllinien von Hepatozellulären Karzinomen (HCC) konnte festgestellt werden, dass RacGAP1 die virale Replikation des Hepatitis-C-Virus fördert, indem es mit der Viruspolymerase NS5B interagiert und diese aktiviert. Somit trägt es auch zum Fortschreiten einer HCC-Erkrankung bei (Wu et al. 2014b).

In einer neuen Studie von Hazar-Rethinam et al. (2015) wurde an Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs sogar gezeigt, dass RacGAP1 an einer Doxorubicin-Resistenz beteiligt ist, indem es nach Doxorubicingabe über den Transkriptionsfaktor E2F7 aktiviert wird und über eine AKT-Aktivierung die Sensitivität für Doxorubicin herabsetzt. Die Ansprechbarkeit dieser Tumorgruppe blieb jedoch erhalten, wenn RacGAP1 herunterreguliert wurde.

Zahlreiche Funktionen des RacGAP1 sind noch ungeklärt, doch scheint es zusammenfassend eine zentrale Rolle in der Tumorgenese, -entwicklung und -progression zu spielen. Wenige klinische Studien an sehr verschiedenen Tumorentitäten existieren bereits hierzu, die jedoch alle eine Überexpression im Vergleich zum Normalgewebe zeigen und eine prognostische Aussage hinsichtlich höherer Tumorinvasivität /-aggressivität und Metastasierung liefern (Wang et al. 2011, Chang et al. 2013, Ke et al. 2013, Liang et al. 2013, Milde-Langosch et al. 2013, Pliarchopoulou et al. 2013, Saigusa et al. 2015). Die Daten erlauben bisher jedoch nur punktuelle Einblicke. Ein Gesamtbild der RacGAP1-Interaktionen kann aktuell noch nicht wiedergegeben werden.



### 3 Ziele der Arbeit

Die heterogene Tumorgruppe der BP-NEN reicht von den gut-differenzierten, prognostisch günstigen TC über die intermediären AC bis hin zu den schlecht-differenzierten und frühzeitig metastasierenden SCLC und LCNEC. Obwohl sie im Vergleich zu den gut untersuchten GEP-NEN durch ein aggressiveres Wachstumsverhalten gekennzeichnet sind, wurden die BP-NEN wegen ihres seltenen Vorkommens bisher nur unzureichend charakterisiert.

Durch eine Kooperation mit der Zentralklinik Bad Berka, einem ENETS Center of Excellence, wurden für die vorliegende Arbeit FFPE und klinische Daten eines großen Patientenkollektivs mit insgesamt 115 BP-NEN-Patienten (26 TC, 30 AC, 52 SCLC, 7 LCNEC) zur Verfügung gestellt und somit ermöglicht, die Tumorgruppe auf die Expression verschiedener Marker hin zu analysieren, um Patienten neue Wege in der Diagnostik und Therapie dieser Tumorerkrankung zu eröffnen. Da SSTR in GEP-NEN bereits fester Bestandteil in der Diagnostik (Untersuchung als neuroendokriner Marker in der Pathologie, SSTR-basierte PET/CT, SRS) und stratifizierten Therapie (pharmakologische SSA-Therapie, PRRT) dieser Tumore sind, war es nun eine zentrale Frage dieser Arbeit, die SSTR-Subtypenverteilung in den BP-NEN-Entitäten aufzudecken, um somit Rückschlüsse auf die Sinnhaftigkeit einer SSTR-basierten Diagnostik und Therapie bzw. die Wahl des richtigen SSA ziehen zu können. Da eine klare Abgrenzung zwischen den Entitäten aus pathologischer Sicht erschwert sein kann, sollten weiterhin die SSTR als potentielle Cut-off-Marker hierfür betrachtet werden. Dabei sollten die Rezeptorsubtypen sowohl auf Proteinebene mittels IHC als auch auf mRNA-Ebene durch eine qRT-PCR untersucht werden. Ob ein Zusammenhang zwischen den klinischen Daten der Patienten und der SSTR-Subtypenverteilung existiert, stellte eine weitere entscheidende Frage der vorliegenden Arbeit dar (**Manuskript I**). Aufgrund der Uneinheitlichkeit der Auswertungssysteme für die routinopathologische SSTR-IHC, sollte die vorliegende Arbeit weiterhin eine Hilfestellung zur Standardisierung darstellen. Drei bewährte Scoring-Systeme für die SSTR-IHC-Evaluierung wurden dabei auf Zuverlässigkeit und Stimmigkeit miteinander verglichen sowie deren Praktikabilität aufgezeigt (**Manuskript II**).

Für das Grading der GEP-NEN wird seit einigen Jahren der Ki-67-Labeling-Index genutzt. Ähnlich wie bei den SSTR, wird sein Einsatz in BP-NEN aufgrund der geringen Studienlage derzeit noch gegensätzlich diskutiert und sollte daher in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet werden. Anknüpfend an die derzeitigen Diskussionen zur optimalen IHC-Auswertungs-Methodik sollte dabei eine digitale Bildanalyse der Ki-67-Expression mit verschiedenen manuell-visuellen Methoden verglichen sowie die Ki-67-mRNA-Analyse auf Eignung geprüft werden. Eine weitere bedeutende Frage dabei stellte die Wahl der entsprechenden Cut-off-Werte zwischen den einzelnen Entitäten dar, aus welchen sich die Prognose sowie Konsequenzen für das weitere diagnostische und therapeutische Vorgehen ableiten. Ob

---

andere in NEN bisher noch nicht betrachtete Marker, die TOP2A und das RacGAP1, bezüglich einer Aussage hinsichtlich des Gradings, der Prognose und der Klassifikation von BP-NEN besser geeignet sind, sollte ebenfalls geklärt werden (**Manuskript III**).

Zusammenfassend sollte diese Arbeit den Kenntnisstand in Bezug auf die Diagnostik von BP-NEN erweitern sowie einen Beitrag dazu leisten, die Methoden zu standardisieren. Durch die intensive Rezeptorcharakterisierung sollten neue Möglichkeiten in der bildgebenden Diagnostik und schließlich in der Therapie dieser seltenen Tumorgruppe eröffnet werden.

## 4 Publierte Originalarbeiten

### 4.1 Manuskript I

#### **Somatostatin Receptors in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms: New Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Markers**

---

J Clin Endocrinol Metab, March 2015, 100(3):831-840

Daniel Kaemmerer\*, Elisa Specht\*, Jörg Sänger, Ralph Markus Wirtz, Manal Sayeg, Stefan Schulz, Amelie Lupp

*eingereicht am 18. Juni 2014*

*angenommen am 09. Dezember 2014*

*online publiziert am 12. Dezember 2014*

#### **Autorenschaft**

Geteilte Erstautorenschaft mit Daniel Kaemmerer (\*)

#### **Beitrag der Autoren**

Amelie Lupp, Daniel Kämmerer und Elisa Neubauer haben das Projekt entworfen. Manal Sayeg hat bei der Vorprobenauswahl assistiert und Jörg Sänger alle Präparate histologisch verifiziert. Der experimentelle Teil der IHC wurde durch Amelie Lupp und Elisa Neubauer durchgeführt, wofür Stefan Schulz die Antikörper zur Verfügung stellte. Die Durchführung der qRT-PCR fand unter der Leitung von Ralph M. Wirtz durch Elisa Neubauer in Köln statt. Die klinischen Daten wurden durch Daniel Kämmerer und Elisa Neubauer zusammengestellt und die Gesamtdaten schließlich durch Elisa Neubauer ausgewertet. Das finale Manuskript haben Daniel Kämmerer und Elisa Neubauer unter der Aufsicht von Amelie Lupp verfasst. Stefan Schulz stand bei der Manuskripterstellung beratend zur Seite.

## Zusammenfassung

Da die Expression von Somatostatinrezeptoren in BP-NEN bisher nur sehr unzureichend untersucht wurde, gibt es noch keine Evidenz für SSTR-geführte Diagnostik und Therapieansätze in dieser Tumorgruppe. Um die molekulare Basis hierfür zu erschließen, wurden in der umfassenden Studie des **Manuskriptes I** Paraffin-eingebettete, Formalin-fixierte Tumorproben (FFPE) eines großen Kollektivs von 90 Patienten mit BP-NEN (26 TC-, 30 AC- und 34 SCLC-Patienten) retrospektiv auf eine Expression aller fünf SSTR-Subtypen sowohl auf Proteinebene mittels IHC, als auch auf mRNA-Ebene durch eine qRT-PCR analysiert. Daraus ergab sich, dass in beiden verwendeten Methoden der SSTR1, der SSTR2A sowie der SSTR5 die am häufigsten exprimierten Rezeptorsubtypen der pulmonalen NEN darstellten. Der SSTR2A und der SSTR5 waren dabei in allen drei untersuchten Entitäten zu etwa 45% gleichmäßig positiv, wohingegen der SSTR1 in TC und AC fast immer nachweisbar war, in SCLC hingegen kaum bzw. gar nicht exprimiert wurde. Dieser Rezeptorsubtyp kann somit als potentieller Cut-off-Marker zwischen AC und SCLC fungieren. In einer Korrelation mit klinischen Patientendaten zeigte sich weiterhin eine prognostische Aussage: hohe SSTR1-Level korrelierten mit einem längeren Überleben. Aufgrund der hochsignifikanten Übereinstimmung der IHC mit der qRT-PCR können beide Methoden für die molekulare SSTR-Diagnostik verwendet werden. Zusammenfassend lässt sich aus dem **Manuskript I** schlussfolgern, dass eine SSTR-basierte stratifizierte Diagnostik und Therapie nicht nur in GEP-NEN, sondern auch in BP-NEN angewendet werden kann, wobei der Schwerpunkt auf dem Einsatz von Pan-SSA liegen sollte, da diese eine bessere Übereinstimmung des Bindungsprofils mit dem in BP-NEN vorliegenden SSTR-Expressionsspektrum aufweisen.

Die *Supplemental Data* des **Manuskriptes I** befinden sich im Anhang A).

## Somatostatin Receptors in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms: New Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Markers

Daniel Kaemmerer,\* Elisa Specht,\* Jörg Sängler, Ralph Markus Wirtz, Manal Sayeg, Stefan Schulz, and Amelie Lupp

Department of General and Visceral Surgery (D.K.), Zentralklinik Bad Berka, 99437 Bad Berka, Germany; Institute of Pharmacology and Toxicology (E.S., S.S., A.L.), Jena University Hospital, 07747 Jena, Germany; Laboratory of Pathology and Cytology (J.S.), 99437 Bad Berka, Germany; STRATIFYER Molecular Pathology GmbH (R.M.W.), 50935 Cologne, Germany; and Department of Internal Medicine, Gastroenterology, and Endocrinology (M.S.), Zentralklinik Bad Berka, 99437 Bad Berka, Germany

**Context and Objectives:** Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms are known for their overexpression of somatostatin receptors (SSTRs), which provide the molecular basis for diagnostic and therapeutic interventions. In contrast, few data on the SSTR expression profile exist for bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms (BP-NEN).

**Design and Settings:** A total of 240 formalin-fixed, paraffin-embedded specimens from 26 typical carcinoid (TC), 30 atypical carcinoid (AC), and 34 small cell lung cancer (SCLC) patients were examined retrospectively by immunohistochemistry (IHC) using specific rabbit monoclonal antibodies and evaluated by the immunoreactive score. Adjacent slides from 20 samples of each tumor type were subjected to additional RT-quantitative PCR mRNA analysis.

**Results:** With different expression patterns, SSTRs were present in most of the tumor sections, at both the protein and mRNA levels. The RT-quantitative PCR data correlated with the IHC scores. SSTR1 was detected in approximately 65% of the TC and AC, but hardly in the SCLC, whereas both SSTR2A and SSTR5 were present in approximately 45% of each entity. Furthermore, the SSTR1 expression level was positively correlated with patient survival.

**Conclusions:** Our results suggest that SSTRs can be used as novel diagnostic, prognostic, and therapeutic markers of BP-NEN. The differences in the SSTR expression profile between the three types of BP-NEN may help to set a diagnostic cutoff and predict patient prognosis. Similar to TC and AC, our results also revealed a previously unappreciated high level of SSTR2A expression in SCLC within a subgroup of patients. However, in most cases, pan-somatostatin analogs may represent an additional therapeutic option. (*J Clin Endocrinol Metab* 100: 831–840, 2015)

According to the 2004 World Health Organization classification, bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms (BP-NEN) comprise four tumor entities, which differ with respect to their dignity and differentiation: well-differentiated typical carcinoids (TC), intermediate

atypical carcinoids (AC), poorly differentiated small cell lung cancers (SCLC), and large cell neuroendocrine carcinomas (1–6). From the pathology point of view, it is extremely difficult to distinguish AC from SCLC, particularly with highly proliferative or poorly differentiated

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2015 by the Endocrine Society

Received June 18, 2014. Accepted December 9, 2014.

First Published Online December 12, 2014

\* D.K. and E.S. contributed equally to this manuscript.

Abbreviations: AC, atypical carcinoid; BP-NEN, bronchopulmonary NEN; CT, computed tomography; FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded tumor block; GEP-NET, gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor; IHC, immunohistochemistry; IRS, immunoreactivity score; NEN, neuroendocrine neoplasm; PET, positron emission tomography; ROC, receiver operating characteristic; qRT-PCR, quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction; SCLC, small cell lung cancer; SSA, somatostatin analog; SSTR, somatostatin receptor; TC, typical carcinoid; TMA, tissue microarray.

AC, and there is currently a lack of useful cutoff markers for that purpose (5, 7–9).

Neuroendocrine neoplasms (NEN) are known for the overexpression of somatostatin receptors (SSTR), which provide a molecular basis for diagnostic and therapeutic interventions. These G protein-coupled receptors consist of five family members, SSTR1 to -5; the SSTR2 exists in two splice variants: the unspliced SSTR2A and the spliced SSTR2B, the presence of which in humans is discussed controversially (10).

Because the SSTR2A is the “primary target” of the currently used somatostatin analogs (SSAs) and because this SSTR subtype is present in > 80% of intestinal NENs, SSTR imaging, pharmacotherapy, and radiotherapy have become a routine procedure in managing gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NET) (11–19). In contrast, no sufficient data are yet available for BP-NEN (3), although some case reports and retrospective series describe the successful use of SSTR imaging (eg, positron emission tomography [PET]/computed tomography [CT]) (3, 21, 22).

To verify the use of SSTR-mediated diagnostic and therapeutic principles for BP-NEN, our objectives were: 1) to evaluate the hitherto insufficiently characterized SSTR subtype distribution in TC, AC, and SCLC at the mRNA and protein level; 2) to search for a cutoff marker among the SSTR subtypes to differentiate between AC and SCLC; and 3) to correlate the expression of SSTR subtypes with patient survival and grading.

## Patients and Methods

### Patients

A total of 240 formalin-fixed, paraffin-embedded tumor blocks (FFPEs) from 90 patients were provided by the Laboratory of Pathology and Cytology, Bad Berka, Germany. Following the Union for International Cancer Control and World Health Organization guidelines, two different pathologists histologically verified each tumor sample. Twenty-six patients were diagnosed with TC, 30 with AC, and 34 with SCLC (Figure 1). Of those collected, two patients were staged by a <sup>68</sup>Ga-DOTATOC PET/CT, and one of these was treated 6 months before surgery with four cycles of chemotherapy (cisplatin + etoposide). All the other patients were treated surgically as first-line therapy. From the individual patients, either the primary tumor or the metastasis was available, but not both together (Table 1 and Supplemental Table 1). The sample material comprised mainly resected specimens, but in some cases biopsies were additionally available from the same patients. Depending on the tumor size, primary tumor samples were divided into two or three parts and embedded in separate paraffin blocks. In case of multifocal metastases (eg, lymph node metastases), different FFPEs from the same patient were obtained. Thus, the number of samples varied from one to 16 FFPEs per patient.

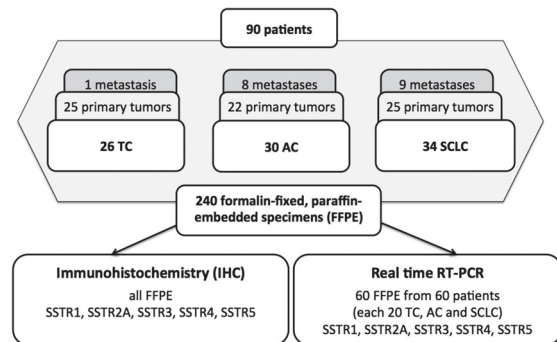


Figure 1. Consort diagram.

A positive vote was obtained from the local ethics committee for this retrospective study.

### Immunohistochemistry (IHC)

From the FFPE, 4-μm-thick sections were cut and floated onto positively charged slides. Subsequent IHC was performed for all 240 FFPEs by an indirect peroxidase method as described previously (23). Briefly, after deparaffinization, an antigen retrieval was performed by boiling the sections in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) for 16 minutes at 600 W. The sections were incubated overnight at 4°C with the specific monoclonal rabbit antibodies (cell supernatants of the cell clones) directed against the respective carboxyl-terminal tail of the different SSTRs (hSSTR1—UMB-7, rabbit monoclonal, 1:30 [23]; hSSTR2A—UMB-1, rabbit monoclonal, 1:10 [10]; hSSTR3—UMB-5, rabbit

Table 1. Patient Characteristics

Characteristic	No. of Patients			
	TC	AC	SCLC	Total
Sex				
Males	7	15	22	44
Females	19	15	12	46
Age, y				
≤50	3	8	5	16
>50	23	22	29	74
Median	59.90	58.32	59.92	59.38
SD	14.85	15.26	9.40	13.08
Grading				
G1	20	7	0	27
G2	4	18	0	22
G3	2	5	34	41
Metastases				
Yes	1	8	9	18
No	25	22	25	72
Metastatic sites				
Lymph nodes	1	7	n.d.	8
Liver	1	2	n.d.	3
Other	1	4	4	9
Clinical syndromes				
Present	3	5	n.d.	8
Absent	23	25	n.d.	48
Chromogranin A				
Positive	25	29	29	83
Negative	1	0	3	4

Abbreviation: n.d., no data.

doi: 10.1210/jc.2014-2699

jcem.endojournals.org 833

monoclonal, 1:20 [24]; and hSSTR5—UMB-4, rabbit monoclonal, 1:10 [25], Epitomics; and hSSTR4—4802, rabbit polyclonal, 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , Gramsch Laboratories). Detection of the primary antibodies was visualized using 3-amino-9-ethylcarbazole in acetate buffer (BioGenex). Sections were then rinsed, counterstained with Mayer's hematoxylin, and mounted in Vectamount mounting medium (Vector Laboratories). For immunohistochemical controls, the SSTR antibodies were adsorbed for 2 hours at room temperature with 10  $\mu\text{g/mL}$  of the peptide used for the immunizations (Supplemental Figure 1). Positive controls for SSTR1, -2A, -3, and -5 were FFPEs from human pancreata, and controls for SSTR4 were FFPEs from human cortices.

All sections were scored by the semiquantitative immunoreactivity score (IRS) according to Remmele and Stegner (26), as modified by McCarty et al (27), multiplying the percentage of positive cells in five gradations (0, 1, 2, 3, 4) with the staining intensity in four gradations (0, 1, 2, 3). As a result, score values between 0 and 12 were obtained. If one tumor section had different staining intensities to a different extent, the percentage of positive cells was multiplied with each staining intensity, and an arithmetic average was calculated. Finally, every tumor slide received one IRS. In case that one patient had more than one tumor slide, an arithmetic mean was calculated from the IRS of each slide. Thus, one IRS for each SSTR for each patient was obtained, and these data are summarized in Supplemental Table 1. For further statistical analysis, the IRS was additionally divided into a four-point classification (IRS 0–1 = IRS classification 0; IRS 2–3 = IRS classification 1; IRS 4–8 = IRS classification 2; and IRS 9–12 = IRS classification 3) (see also Supplemental Figure 2). According to the definition of Remmele and Stegner (26), a sample with an IRS classification of 3 was considered positive.

### Quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR)

In cooperation with STRATIFYER Molecular Pathology, Cologne, Germany, one adjacent paraffin section from each of the immunohistochemical slides from 60 patients (20 TC, 20 AC, and 20 SCLC, which were randomly and blindly selected) were purified fully automatically to measure the mRNA and thus detect SSTR expression at the transcriptional level. At the time of the PCR data collection, the immunohistochemical studies had not yet been evaluated, and the results of both methods were determined blindly and independently.

Sufficient mRNA was isolated from FFPE specimens using a standardized isolation method, based on magnetic beads [Extraction-XL (96) RNA 2.0 kit; STRATIFYER Molecular Pathology] as previously described (28). Directly after extraction, multiplex TaqMan-real-time PCR was performed fully automated using the SuperScript III Platinum One-Step real-time RT-PCR kit and the Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). Primers and probes for the SSTR subtypes were designed by STRATIFYER Molecular Pathology and prepared by Eurogentec. The housekeeping gene CALM2 (calmodulin 2) was used as a control. Additionally, a NTC (no-template control) and a human reference RNA (Agilent Technologies, Germany) were analyzed in parallel. Measurements were conducted on an Mx3005P device using the MxPro version 4.10d software (Agilent Technologies, Germany). After 40 cycles (50 min at 30°C, 2 min at 95°C [15 s at 95°C, 45 s at 60°C]  $\times$  40), a logarithmic analysis was performed at a threshold of 50. The values were normalized using the following formula:  $\text{dCt(Norm)} = 40 - \Delta\text{Ct}$

$(\text{Ct(SSTR)} - \text{Ct(CALM2)})$ . As a result, dCt values  $\geq 19.00$  were obtained and used for further calculations. Because values  $\geq 27.00$  mark the limit of detection of the respective assay system, they were classified as positive. In addition, a four-point classification was implemented, similar to that used for the immunohistochemical IRS (dCt values  $< 23.78$  = PCR classification 0; dCt values 23.78–28.55 = PCR classification 1; dCt-values 28.56–33.33 = PCR classification 2; and dCt values  $> 33.33$  = PCR classification 3). For each SSTR, the data of all patients are summarized in Supplemental Table 1.

### Statistics

For statistical analysis, the IBM SPSS statistics program version 20.0.0 was used. The statistics were done on the individual mean IRS and the dCt values of the SSTR, as well as on grading and survival (in terms of months) of the patients. Because the data were not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test), Spearman's rank correlation, Mann-Whitney, and Kendall's  $\tau$ -c test were performed. For survival analysis, the Kaplan-Meier method with a log-rank test was used. A  $P$  value  $< .05$ / $< .01$  was considered significant/highly significant.

## Results

### Frequency statistics

#### Immunohistochemistry

Of all the SSTR, SSTR1 was expressed most frequently in the BP-NEN, whereas SSTR4 and SSTR3 were present only rarely and usually with low intensity. Here, membrane-bound immunostaining was obtained for SSTR2A. Staining for SSTR1, SSTR3, and SSTR5 was both membrane-bound and cytoplasmic, whereas that for SSTR4 was exclusively cytoplasmic (Figure 2). In some cases, there was a heterogeneous staining intensity both within one sample and between different samples from single patients.

The percentage of positivity for each SSTR subtype in each entity is shown in Table 2.

#### qRT-PCR

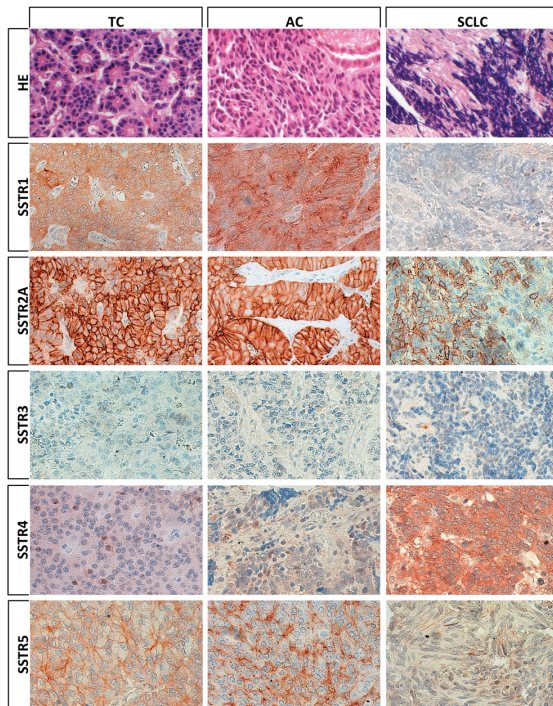
According to the mRNA analysis, SSTR5 was the receptor most frequently present, followed by SSTR2A and SSTR1. Similar to the IHC, differences in the SSTR positivity existed between the entities (Table 2).

#### Correlation of IHC with qRT-PCR

The frequency distributions of the SSTR subtypes between the IHC and qRT-PCR results were very similar and corresponded well with each other (Figure 3).

The Spearman rank correlation showed that the expression intensities of the SSTR subtypes between the two detection methods correlated with each other, too (Figure 3). There was a highly significant interconnection for SSTR2A and SSTR1. The SSTR5 expression also signifi-





**Figure 2.** Immunohistochemical staining of the different entities. The hematoxylin-eosin (HE) staining depicts a TC with distinct acinar and rosette-like structures; an AC with cell palisades, multiform cell nuclei, and nuclear molding; and a SCLC with oat-shaped cells, crushing artifacts, and necrotic areas. SSTR1 showed cytoplasmic but also partly membrane-specific staining. SCLC were mostly SSTR1 negative. For SSTR2A, a distinct membrane-bound immunoreactivity was observed in the positive specimens of all three entities, whereas almost none of the samples displayed SSTR3 expression. SSTR4 showed characteristic cytoplasmic staining, and with the SSTR5, both membranous and cytoplasmic immunoreactivity was observed.

cantly correlated between the two methods, but there was no significant correlation for SSTR3 or SSTR4.

### SSTR expression intensities

#### Immunohistochemistry

**SSTR1.** The SSTR1 expression intensity in the SCLC (median IRS = 1) was significantly lower than that in the AC

and TC. The Mann-Whitney test revealed highly significant differences between the entities (AC and SCLC,  $U = 180.0$ ,  $P < .001$ ; TC and SCLC,  $U = 141.0$ ,  $P < .001$ ). SCLC displayed the lowest interquartile range, and 75% of the values were below an IRS of 2 points (Figure 4A). TC had the largest interquartile range, covering all the IRS points from 0 to 12. The median for the TC was 6.5, which was higher than that for the AC.

**SSTR2A.** The SSTR2A expression had a median value of 2 IRS points for all three cancer types and was expressed either very strongly or not at all. There were no significant differences in SSTR2A expression between TC, AC, and SCLC (TC and AC,  $U = 341.5$ ,  $P = .412$ ; AC and SCLC,  $U = 465.5$ ,  $P = .541$ ) (Figure 4C).

**SSTR3.** Few samples displayed SSTR3 expression, which was always weak ( $IRS \leq 4$ ). No differences were observed among the cancer types.

**SSTR4.** In all three entities, SSTR4 was only weakly expressed compared with the other subtypes. The staining intensity scored mostly around 2 IRS points and was never higher than 8 IRS points. The median SSTR4 expression value among all the BP-NEN was 0 IRS points.

**SSTR5.** There were significant differences in SSTR5 expression between TC and SCLC ( $U = 288.0$ ;  $P = .018$ ) and between AC and SCLC ( $U = 338.0$ ;  $P = .018$ ) (Figure 4E). The SCLC had the lowest median and the smallest interquartile range. The AC showed the broadest span, and with 4 IRS points, the median of the AC was significantly higher than that of the TC and the SCLC.

#### qRT-PCR

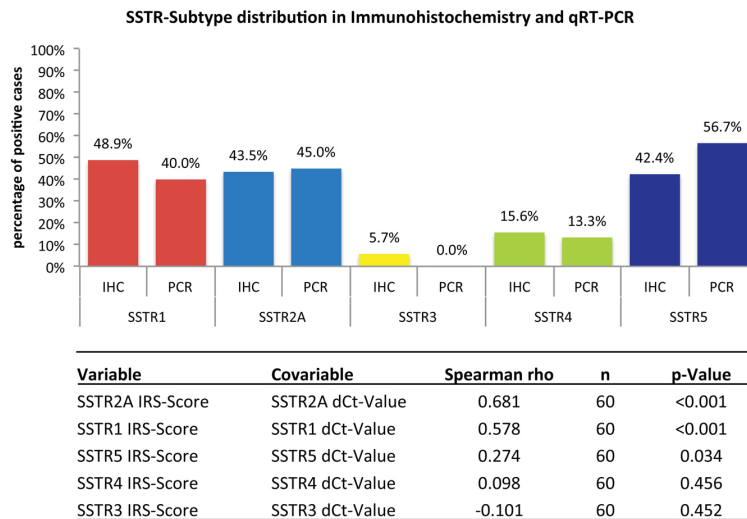
**SSTR1.** There were highly significant differences in SSTR1 expression between AC and SCLC ( $U = 74.5$ ;  $P < .001$ ) and between TC and SCLC ( $U = 97.5$ ;  $P < .001$ ). As shown in the boxplots in Figure 4B, SSTR1 mRNA was detected in only one SCLC, whereas the TC and the AC showed consistently high SSTR1 expression levels.

**SSTR2A.** SSTR2A expression was similar among all three tumor types (TC and AC,  $U = 168.0$ ,  $P = .360$ ; AC and SCLC,  $U = 175.0$ ,  $P = .482$ ). The low median (dCt = 19.00) indicates that 50% of the TC did not express SSTR2A (Figure 4D).

**SSTR3.** SSTR3 mRNA was detected in two samples, but it was at such low intensity ( $IRS < 2$ ) that it was classified as negative.

**Table 2.** Percentage of Positive Patients in the IHC and in the qRT-PCR

	IHC (n = 90)				Real-time qRT-PCR (n = 60)			
	TC	AC	SCLC	Total	TC	AC	SCLC	Total
SSTR1	76.9	66.7	14.7	48.9	50.0	65.0	5.0	40.0
SSTR2A	42.3	43.3	47.1	43.5	40.0	45.0	50.0	45.0
SSTR3	0.0	3.3	9.4	5.7	0.0	0.0	0.0	0.0
SSTR4	19.2	10.0	17.6	15.6	5.0	25.0	10.0	13.3
SSTR5	42.3	60.0	29.4	42.4	60.0	65.0	40.0	56.7



**Figure 3.** Frequency distribution and Spearman's rho of the SSTR subtypes in both IHC and qRT-PCR. The percentage of positive cases (IHC, IRS  $\geq 3$ ; qRT-PCR, dCt  $\geq 27.00$ ) for each SSTR subtype is shown. The table below depicts the respective Spearman's rank correlations. The IRS values of the IHC were used as variables, and the dCt values of the qRT-PCR were used as covariates. Overall, 60 patients were considered. PCR represents qRT-PCR. Red, SSTR1; light blue, SSTR2A; yellow, SSTR3; green, SSTR4; dark blue, SSTR5.

**SSTR4.** SSTR4 mRNA was present in very few samples and only at very low intensity. Between the three tumor entities, no significant differences were seen.

**SSTR5.** The intensity of SSTR5 mRNA expression gradually decreased toward the poorly differentiated tumor types (Figure 4F). The Mann-Whitney test (U) indicated a significantly different expression between the SCLC and the other two tumor types (TC and SCLC, U = 141.0,  $P = .094$ ; AC and SCLC, U = 124.0,  $P = .037$ ). SSTR subtype correlations (IHC, qRT-PCR) are shown in Supplemental Figures 3 and 4.

#### Correlation with clinical and histopathological data

##### Grading

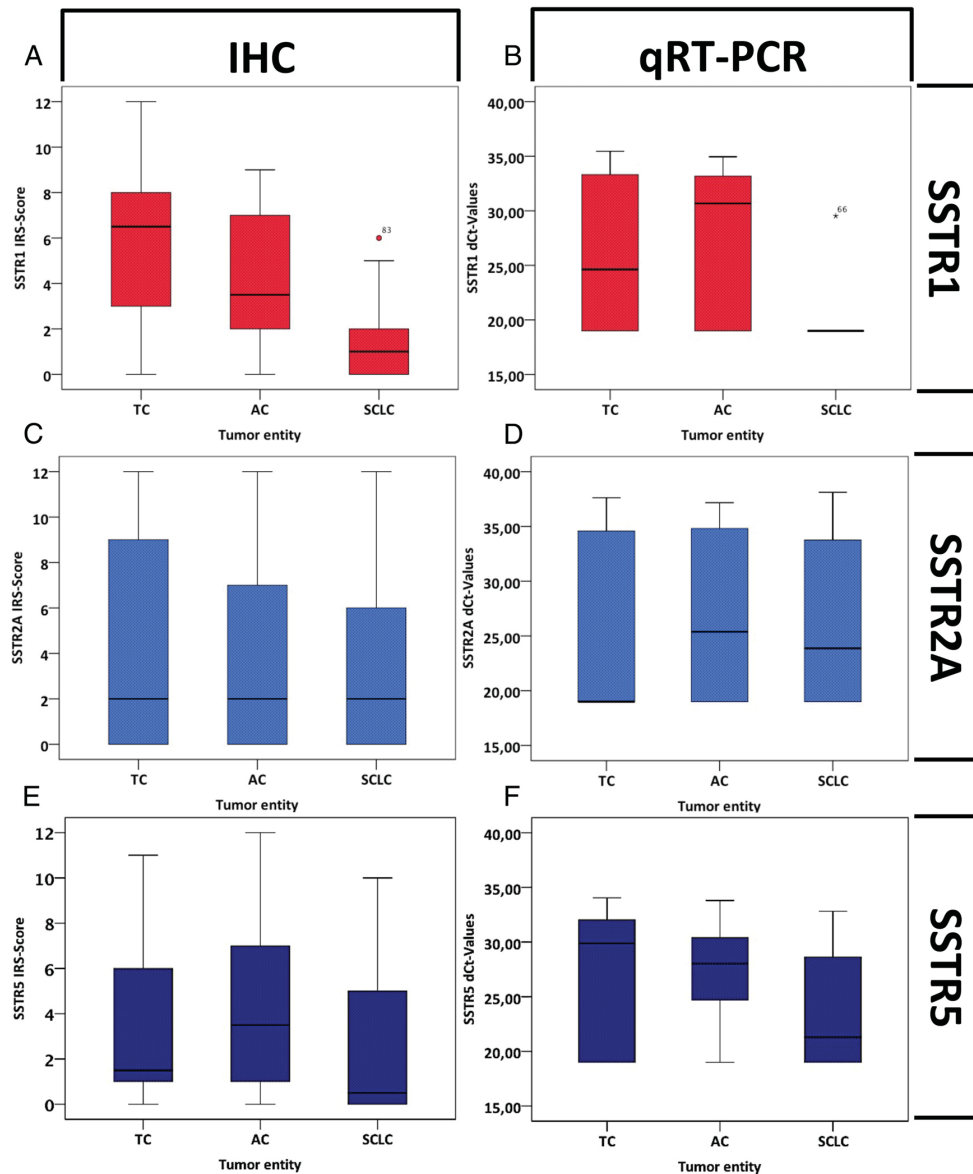
According to the European Neuroendocrine Tumor Society Consensus Guidelines, 27 of the patients with BP-NEN were G1, 22 were G2, and 41 were G3 status. The Kendall  $\tau$ -c test revealed negative correlations between the grading and the expression of SSTR1 and SSTR5, respectively, in both the IHC and the qRT-PCR (SSTR1—IHC,  $\tau_c = -0.439$ ,  $P < .001$ ; qRT-PCR,  $\tau_c = -0.444$ ,  $P < .001$ ; and SSTR5—IHC,  $\tau_c = -0.210$ ,  $P = .024$ ; qRT-PCR,  $\tau_c = -0.275$ ,  $P = .023$ ). Furthermore, there was a positive correlation between SSTR4 expression, as determined by IHC, and the grading ( $\tau_c = -0.253$ ;  $P = .006$ ).

#### Survival

In a Kaplan-Meier analysis, the IRS and PCR classifications of the SSTR subtypes were evaluated with respect to the survival time of the patients (event = tumor-related death). For SSTR1 expression, assessed by both methods, there was a significant correlation with the survival time: the stronger the SSTR1 expression, the better the survival of the patients (Figure 5). This result was confirmed by the log-rank test.

#### Discussion

We evaluated the SSTR expression in a large series of patients with BP-NEN by IHC and qRT-PCR, at both the protein and mRNA levels. Our investigation can be considered representative because it comprises a large number of cases, comparable subgroup sizes, and clinical and follow-up parameters. With the sole exception of the antibody directed against SSTR4, monoclonal antibodies were used for the IHC. Other studies of SSTR protein expression examined either a small number of samples (23–25, 29–33) or only single receptor subtypes (8, 23–25, 29, 31, 32, 34). SSTR2A, SSTR3, and SSTR5 have been examined frequently, whereas SSTR1 and, particularly, SSTR4 have been evaluated only rarely by IHC. The only comprehensive study to date was carried out by Tsuta et al (35), who investigated all SSTR subtypes in all BP-NEN entities by IHC but only considered tissue microarrays (TMA), which in the case of heterogeneous SSTR expression (as observed in our study) may lead to misjudgment of the samples. An equally comprehensive quantification of SSTR mRNA in BP-NEN has not previously been performed. Instead, only certain cancer types (36), receptor subtypes (31, 34), or small numbers of cases (31, 34, 37) were analyzed, which were only part of a larger, general study of NEN (30, 38). Also, currently recruiting studies focus on pulmonary NEN only as a complementary cancer type (eg, RADIANT-4). There is a 2010 North American Neuroendocrine Tumor Society guideline for the diagnosis and management of well-differentiated neuroendocrine tumors of the thorax (39). Here, information on SSTR diagnostics (Octreoscan recommended, SSTR PET/CT in need of more clinical trials) and SSTR therapeutics (octreotide for symptom control) are given. Our study may serve as a basis to extend SSTR



**Figure 4.** Box plots of the expression levels of SSTR subtypes 1, 2A, and 5. The figure shows the box plots of the SSTR expression levels as determined by IHC (left) or qRT-PCR (right). The IRS values were plotted for the IHC, and the dCt values were plotted for the qRT-PCR against the tumor entities for SSTR1 (A and B), SSTR2A (C and D), and SSTR5 (E and F). The median with the upper and lower quartiles is depicted with the respective whiskers and outliers.

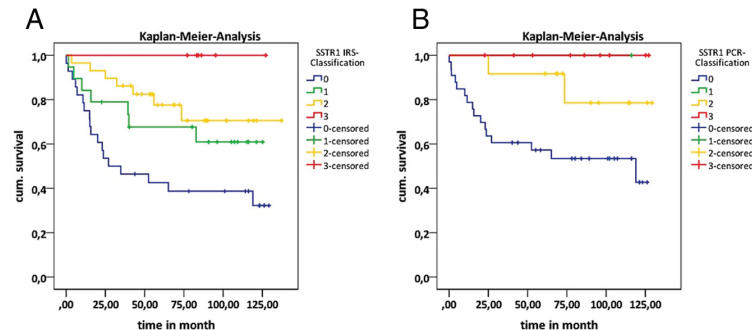
diagnostics and SSTR therapies in BP-NEN and to conduct more clinical trials in this regard.

Pelosi et al (37) first reported on the possibility of using SSA in the nuclear diagnosis and treatment of BP-NEN. The clinical significance is further underlined by case reports and some clinical series that corroborate the finding that the current diagnostics (CT, bronchoscopy) are inadequate (3, 21, 22). Until now, a comprehensive study of SSTR expression in BP-NEN was missing.

In the present study, we found frequent positivity in both methods for SSTR1, which significantly declined, however, from the better to the poorly differentiated tumor entities. In TC and AC, SSTR1 was the most frequently expressed SSTR subtype, whereas it was significantly less common in SCLC, corresponding well to the findings of Tsuta et al (35), where SSTR1 also declined to the SCLC. The current classification system of BP-NEN is based on two grading systems that include the number of

doi: 10.1210/jc.2014-2699

jcem.endojournals.org 837



**Figure 5.** Kaplan-Meier analysis of the SSTR1 expression. The cumulative survival of the patients in relation to the SSTR1 expression level evaluated by IHC (A) or qRT-PCR (B) is shown. With both methods, the expression intensities were plotted as 0 (no expression, blue), 1 (low expression, green), 2 (moderate expression, yellow), and 3 (strong expression, red). An event was defined as a tumor-related death. A, For the immunohistochemical analysis, material from 82 patients was available, 32 of whom had died due to the tumor (IRS classification 0: 28 patients, 18 events; IRS classification 1: 19 patients, 7 events; IRS classification 2: 29 patients, 7 events; IRS classification 3: 6 patients, no events). The log-rank test gave a value of 13.920 ( $P = .003$ ). B, For the qRT-PCR, material from 56 patients was available, 18 of whom had died due to the tumor (PCR classification 0: 33 patients, 16 events; PCR classification 1: 1 patient, no events; PCR classification 2: 12 patients, 2 events; PCR classification 3: 10 patients, no events). The log-rank test gave a value of 9.935 ( $P = .019$ ).

mitoses and the extent of necrosis (39). The transitions between the entities are fluid (TC to AC, AC to SCLC/large cell neuroendocrine carcinoma), and in cases of poorly differentiated but low proliferative tumors (eg, AC/SCLC), it is difficult to distinguish clearly (the same holds true for well-differentiated but highly proliferative tumors) (5, 8, 40). Here, an additional marker could help to make the decision easier. To the best of our knowledge, in this context and beyond, the role of Ki-67 in BP-NEN is still controversial (41, 42). In this respect, we recommend the use of the SSTR1 expression level as an additional cutoff marker to facilitate the diagnosis of borderline AC and SCLC. Therefore, SSTR1 could be used as a supplementary cutoff marker to distinguish AC from SCLC. In this respect, a receiver operating characteristic (ROC) analysis has been performed additionally (Supplemental Figure 5). According to this analysis, the SSTR1 expression level is clearly well suited as a cutoff marker between the tumor entities (AUC always distinctly higher than 0.5), the IHC (probably due to higher case numbers) being somewhat better in this respect as compared to the PCR. For this reason, in the Kaplan-Meier analysis, the tumor type was not considered, and it was found that the SSTR1 was a strong prognostic marker: high expression favored better survival. However, also within the tumor entities, lower SSTR1 levels correlate with poor patient prognosis, too, but the case numbers within these subgroups are too small to allow for statistical significance, especially because hardly any TC or AC patients died.

In contrast to literature data (30, 31, 35, 37, 43, 44), we were not able to show that SSTR2A is indeed the most

common SSTR subtype expressed in BP-NEN, a result that was confirmed by both of our methods. Similar to the data presented by Righi et al (8), in our study, SSTR2A was positive in about 45% of the patients. Because SSTR2A is much less likely to be expressed in BP-NEN than in GEP-NET, that finding has direct diagnostic and therapeutic consequences with respect to which SSA should be used. However, if present, SSTR2A is expressed very strongly. Hence, this subgroup of patients (even those with SCLC) may benefit from an (additional) octreotide-based therapy.

As described already in literature (30, 45), SSTR3 seems to be expressed in BP-NEN only very rarely (and weakly), or not at all. The fact that in our study both IHC and PCR

did not correlate with each other is most probably due to the low number of SSTR3-positive specimens.

In our study also, SSTR4 expression did not correlate between IHC and PCR. However, a polyclonal antibody was used for the detection of SSTR4, so nonspecific staining, and thus an overestimation of the expression, was to be expected. The homogenous cytoplasmic staining, which was seen in each tumor sample, was excluded in our evaluation, and only an apparently specific immunoreactivity was taken into account. Hence, the incidences of SSTR4 expression observed in the IHC must be regarded as critical. Various commercially available antibodies were tested beforehand, but none gave better staining results (ie, staining of the nuclei only) than the antibody used in our analysis. Therefore, the lack of specific (monoclonal) anti-SSTR4 antibodies may be the reason that SSTR4 has been excluded from many IHC studies (8, 30, 31).

Compared with previous studies (30, 31, 35), in our investigation the SSTR5 was detected more frequently by both methods. A large proportion of the samples was jointly positive for SSTR1 and SSTR5, leading to a highly significant correlation between the respective expression rates as shown in Supplemental Figures 3 and 4. Rocheville et al (46) suggested that these two SSTR subtypes may form heterodimers, and it remains to be established whether that phenomenon occurs frequently in BP-NEN and thus affects the pharmacological activity of SSA.

When comparing the results of our study with the data of Tsuta et al (35) (Supplemental Table 2), it can be seen that SSTR1 and SSTR4 show similar frequency distribu-



tions in both studies. Tsuta et al (35) observed higher SSTR2A and SSTR3 levels than seen in our examinations, whereas the SSTR5 could be detected more frequently in our study. Differences can be explained by the use of different antibodies: Tsuta et al (35) used polyclonal antibodies obtained from Gramsch laboratories, which always show higher background staining in comparison to our monoclonal antibodies. Respective comparative stainings have been performed by our laboratory beforehand (47). Furthermore, Tsuta et al (35) investigated TMAs with a diameter of 1.0 mm only. In our study, mostly whole tumor resectates were examined. Because the SSTR expression pattern is very heterogeneous (as observed in our investigation and as previously seen also in other studies) (24, 30, 37, 43, 48), the evaluation of TMAs can lead to incorrect results. For example, this can be seen from four pictures of a heterogeneous SSTR-expression pattern (Supplemental Figures 6–9). In each of the photomicrographs, three TMAs with 1.00 mm diameter were drawn. This resulted in three different ratings for each tumor specimen.

Finally, it can be concluded that the SSTR mRNA expression level corresponds well with the respective protein level, as previously described in other studies (30, 35). Weak discrepancies between both of these methods can be explained by the fact that SSTR expression could be detected immunohistochemically to a low extent in the tumor stroma: SSTR1 showed positivity in alveolar macrophages and some glandular cells. Vascular endothelial cells and germinal centers of lymph follicles were SSTR2A positive, and immune cells (macrophages and granulocytes) were positive for the SSTR3. Nonetheless, both detection methods indicated that the relative subtype expression levels in TC and AC were  $SSTR1 > SSTR5 > SSTR2A$  and that SSTR2A and SSTR5 were the most frequently expressed subtypes in SCLC, corresponding well to the results of Zatelli et al (36) and van Hoek et al (45). Therefore, (except for the subgroup of patients strongly expressing SSTR2A, but at least for diagnostics) the use of the conventional synthetic SSA for patients with BP-NEN could be replaced by the use of newer pan-SSA. The peptides currently used in the SSTR-PET/CT, DOTA-TOC, and DOTA-TATE and the long-acting SSA used in symptomatic and antiproliferative pharmacotherapy can therefore not be equally employed in gastrointestinal and pulmonary NEN. All of the currently used peptides have a high affinity for SSTR2A ( $IC_{50}$ , between 0.2 and 2.5 nmol/L) and a lower affinity for SSTR5 (73–377 nmol/L) (49). With regard to SSTR1, however, they show very low affinity ( $>10\,000$  nmol/L), so that the receptor, which is very frequently expressed in TC and AC, cannot be targeted using the peptides currently available. Recently, the

second-generation pan-SSA pasireotide (SOM230; Novartis Pharmaceuticals Corporation, Switzerland) was successfully introduced into the market (50–53). With a high binding affinity for SSTR1, SSTR2A, SSTR3, and SSTR5, this new SSA is promising, not least of all in that the antiproliferative effects on GEP-NET, as observed with octreotide in the PROMID (54) and CLARINET study, may be more pronounced with pasireotide. Functional effects of pan-SSA in BP-NEN were observed in the human bronchial carcinoid cell line NCI-H727 in a study by Ono et al (20) in 2007, which showed increased antiproliferative effects of pasireotide (SOM230) in comparison to octreotide. Further clinical trials are ongoing: 1) a three-arm trial to evaluate pasireotide LAR/everolimus alone/in combination in patients with lung/thymus neuroendocrine tumor—the LUNA trial; and 2) a trial of pasireotide LAR and topotecan in relapsed or refractory SCLC.

## Conclusion

We showed that BP-NEN exhibits a broad range of SSTR subtype expression levels. Hence, SSTR can be used as novel diagnostic, prognostic, and therapeutic markers of BP-NEN. It is evident that a high SSTR1 expression level is associated with better patient survival, suggesting that the SSTR1 can be a complementary cutoff marker for diagnosing AC and SCLC. Our results revealed a hitherto unappreciated high level of SSTR2A expression in SCLC within a subgroup of patients, which may be targeted by an (additional) octreotide-based therapy. Because only SSTR1 and SSTR5 were present in sufficient amounts and frequencies, pan-SSA with a high affinity for these subtypes may increase the diagnostic (eg, SSTR-PET/CT) and therapeutic specificity. This also holds true for peptide receptor radionuclide therapy with possibly high response rates in advanced TC and AC. Therefore, a prior evaluation of the SSTR subtype status by IHC or qRT-PCR is strongly recommended.

## Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Daniel Kaemmerer, MD, Department of General and Visceral Surgery, Zentralklinik Bad Berka, Robert-Koch-Allee 9, 99437 Bad Berka, Germany. E-mail: [Daniel.Kaemmerer@zentralklinik.de](mailto:Daniel.Kaemmerer@zentralklinik.de).

This work was supported by the THERANOSTICS Research Center, Zentralklinik Bad Berka, Bad Berka, Germany.

Disclosure Summary: The authors declare no conflicts of interests regarding this manuscript.

## References

1. Bertino EM, Confer PD, Colonna JE, Ross P, Otterson GA. Pulmonary neuroendocrine/carcinoid tumors: a review article. *Cancer*. 2009;115:4434–4441.

doi: 10.1210/jc.2014-2699

jcem.endojournals.org 839

2. Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malfetheriner MV, Modlin IM. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer*. 2008;113:5–21.
3. Hörsch D, Sayeg Y, Bonnet R, Kaemmerer D, Presselt N, Baum RP. [Expert dialogue: neuroendocrine tumours of the lungs and gastroenteropancreatic system]. *Pneumologie*. 2012;66:44–48.
4. Klimstra DS. Pathology reporting of neuroendocrine tumors: essential elements for accurate diagnosis, classification, and staging. *Semin Oncol*. 2013;40:23–36.
5. Siddiqui MT. Pulmonary neuroendocrine neoplasms: a review of clinicopathologic and cytologic features. *Diagn Cytopathol*. 2010;38:607–617.
6. Swarts DR, Ramaekers FC, Speel EJ. Molecular and cellular biology of neuroendocrine lung tumors: evidence for separate biological entities. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826:255–271.
7. Pavel M, Kidd M, Modlin I. Systemic therapeutic options for carcinoid. *Semin Oncol*. 2013;40:84–99.
8. Righi L, Volante M, Tavaglione V, et al. Somatostatin receptor tissue distribution in lung neuroendocrine tumours: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 218 'clinically aggressive' cases. *Ann Oncol*. 2010;21:548–555.
9. Zheng G, Ettinger DS, Maleki Z. Utility of the quantitative Ki-67 proliferation index and CD56 together in the cytologic diagnosis of small cell lung carcinoma and other lung neuroendocrine tumors. *Acta Cytol*. 2013;57:281–290.
10. Fischer T, Doll C, Jacobs S, Kolodziej A, Stumm R, Schulz S. Reassessment of sst2 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:4519–4524.
11. Baum RP, Kulkarni HR. THERANOSTICS: from molecular imaging using Ga-68 labeled tracers and PET/CT to personalized radionuclide therapy—the Bad Berka Experience. *Theranostics*. 2012;2:437–447.
12. Baum RP, Kulkarni HR, Carreras C. Peptides and receptors in image-guided therapy: theranostics for neuroendocrine neoplasms. *Semin Nucl Med*. 2012;42:190–207.
13. Campana D, Capurso G, Partelli S, et al. Radiolabelled somatostatin analogue treatment in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: factors associated with response and suggestions for therapeutic sequence. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;40:1197–1205.
14. Kaemmerer D, Peter L, Lupp A, et al. Comparing of IRS and Her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5:187–194.
15. Kowalski J, Henze M, Schuhmacher J, Mäcke HR, Hofmann M, Haberkorn U. Evaluation of positron emission tomography imaging using [68Ga]-DOTA-D Phe(1)-Tyr(3)-octreotide in comparison to [111In]-DTPAOC SPECT. First results in patients with neuroendocrine tumors. *Mol Imaging Biol*. 2003;5:42–48.
16. Papotti M, Bongiovanni M, Volante M, et al. Expression of somatostatin receptor types 1–5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Virchows Archiv*. 2002;440:461–475.
17. Reubi JC, Schonbrunn A. Illuminating somatostatin analog action at neuroendocrine tumor receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34:676–688.
18. Toumpanakis C, Caplin ME. Update on the role of somatostatin analogs for the treatment of patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Semin Oncol*. 2013;40:56–68.
19. Baum RP, Prasad V, Hommann M, Hörsch D. Receptor PET/CT imaging of neuroendocrine tumors. *Recent Results Cancer Res*. 2008;170:225–242.
20. Ono K, Suzuki T, Miki Y, et al. Somatostatin receptor subtypes in human non-functioning neuroendocrine tumors and effects of somatostatin analogue SOM230 on cell proliferation in cell line NCI-H727. *Anticancer Res*. 2007;27:2231–2239.
21. Kaemmerer D, Khatib-Chahidi K, Paul Baum R, et al. Concomitant lung and gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and the value of gallium-68 PET/CT. *Cancer Imaging*. 2011;11:179–183.
22. Ambrosini V, Castellucci P, Rubello D, et al. 68Ga-DOTA-NOC: a new PET tracer for evaluating patients with bronchial carcinoid. *Nucl Med Commun*. 2009;30:281–286.
23. Lupp A, Nagel F, Schulz S. Reevaluation of sst<sub>1</sub> somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-7. *Regul Pept*. 2013;183:1–6.
24. Lupp A, Nagel F, Doll C, et al. Reassessment of sst3 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-5. *Neuroendocrinology*. 2012;96:301–310.
25. Lupp A, Hunder A, Petrich A, Nagel F, Doll C, Schulz S. Reassessment of sst(5) somatostatin receptor expression in normal and neoplastic human tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-4. *Neuroendocrinology*. 2011;94:255–264.
26. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Der Pathologe*. 1987;8:138–140.
27. McCarty KS Jr, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal anti-receptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med*. 1985;109:716–721.
28. Pentheroudakis G, Batistatou A, Kalogeras KT, et al. Prognostic utility of  $\beta$ -tubulin isotype III and correlations with other molecular and clinicopathological variables in patients with early breast cancer: a translational Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127:179–193.
29. Kimura N, Pilichowska M, Date F, Kimura I, Schindler M. Immunohistochemical expression of somatostatin type 2A receptor in neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res*. 1999;5:3483–3487.
30. Mizutani G, Nakanishi Y, Watanabe N, et al. Expression of somatostatin receptor (SSTR) subtypes (SSTR-1, 2A, 3, 4 and 5) in neuroendocrine tumors using real-time RT-PCR method and immunohistochemistry. *Acta Histochem Cytochem*. 2012;45:167–176.
31. Papotti M, Croce S, Bellò M, et al. Expression of somatostatin receptor types 2, 3 and 5 in biopsies and surgical specimens of human lung tumours. Correlation with preoperative octreotide scintigraphy. *Virchows Archiv*. 2001;439:787–797.
32. Reubi JC, Kappeler A, Waser B, Laissue J, Hipkin RW, Schonbrunn A. Immunohistochemical localization of somatostatin receptors sst2A in human tumors. *Am J Pathol*. 1998;153:233–245.
33. Reubi JC, Waser B, Liu Q, Laissue JA, Schonbrunn A. Subcellular distribution of somatostatin sst2A receptors in human tumors of the nervous and neuroendocrine systems: membranous versus intracellular location. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:3882–3891.
34. Papotti M, Croce S, Macrì L, et al. Correlative immunohistochemical and reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of somatostatin receptor type 2 in neuroendocrine tumors of the lung. *Diagn Mol Pathol*. 2000;9:47–57.
35. Tsuta K, Wistuba II, Moran CA. Differential expression of somatostatin receptors 1–5 in neuroendocrine carcinoma of the lung. *Pathol Res Pract*. 2012;208:470–474.
36. Zatelli MC, Maffei P, Piccin D, et al. Somatostatin analogs in vitro effects in a growth hormone-releasing hormone-secreting bronchial carcinoid. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:2104–2109.
37. Pelosi G, Volante M, Papotti M, Sonzogni A, Masullo M, Viale G. Peptide receptors in neuroendocrine tumors of the lung as potential tools for radionuclide diagnosis and therapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2006;50:272–287.
38. Schmid HA, Lambertini C, van Vugt HH, et al. Monoclonal antibodies against the human somatostatin receptor subtypes 1–5: development and immunohistochemical application in neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*. 2012;95:232–247.
39. Phan AT, Oberg K, Choi J, et al. NANETS consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: well-dif-

- ferentiated neuroendocrine tumors of the thorax (includes lung and thymus). *Pancreas*. 2010;39:784–798.
40. Zheng N, Dai W, Du W, et al. A novel lanreotide-encoded micelle system targets paclitaxel to the tumors with overexpression of somatostatin receptors. *Mol Pharm*. 2012;9:1175–1188.
  41. Pelosi G, Papotti M, Rindi G, Scarpa A. Unraveling tumor grading and genomic landscape in lung neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol*. 2014;25:151–164.
  42. Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol*. 2014;9:273–284.
  43. Volante M, Rosas R, Allia E, et al. Somatostatin, cortistatin and their receptors in tumours. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;286:219–229.
  44. Zarogoulidis K, Eleftheriadou E, Kontakiotis T, et al. Long acting somatostatin analogues in combination to antineoplastic agents in the treatment of small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2012; 76:84–88.
  45. van Hoek M, Hofland LJ, de Rijke YB, et al. Effects of somatostatin analogs on a growth hormone-releasing hormone secreting bronchial carcinoid, in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:428–433.
  46. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem*. 2000;275:7862–7869.
  47. Kaemmerer D, Lupp A, Peter L, et al. Correlation of monoclonal and polyclonal somatostatin receptor 5 antibodies in pancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6:49–54.
  48. Kulaksiz H, Eissele R, Rössler D, et al. Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. *Gut*. 2002;50:52–60.
  49. Antunes P, Ginj M, Zhang H, et al. Are radiogallium-labelled DOTA-conjugated somatostatin analogues superior to those labelled with other radiometals? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007; 34:982–993.
  50. Cukier K, Tewari R, Kurth F, Schmid HA, Lai C, Torpy DJ. Significant response to pasireotide (SOM230) in the treatment of a patient with persistent, refractory Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71:305–307.
  51. Fedele M, De Martino I, Pivonello R, et al. SOM230, a new somatostatin analogue, is highly effective in the therapy of growth hormone/prolactin-secreting pituitary adenomas. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2738–2744.
  52. Schmid HA, Silva AP. Short- and long-term effects of octreotide and SOM230 on GH, IGF-I, ACTH, corticosterone and ghrelin in rats. *J Endocrinol Invest*. 2005;28:28–35.
  53. Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol*. 2002;146:707–716.
  54. Rinke A, Müller HH, Schade-Brittinger C, et al. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. *J Clin Oncol*. 2009;27:4656–4663.



## 4.2 Manuskript II

### **Comparison of Immunoreactive Score, HER2/neu Score and H Score for the Immunohistochemical Evaluation of Somatostatin Receptors in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms**

---

Histopathology, September 2015, 67(3):368-377

Elisa Specht, Daniel Kaemmerer, Jörg Sänger, Ralph Markus Wirtz, Stefan Schulz, Amelie Lupp

*eingereicht am 08. Juli 2014*

*angenommen am 28. Januar 2015*

*online publiziert am 01. Februar 2015*

#### **Autorenschaft**

Erstautor

#### **Beitrag der Autoren**

Diese Studie wurde von Amelie Lupp und Elisa Neubauer konzipiert. Jörg Sänger war dabei der Ansprechpartner für pathologische Fragestellungen. Den experimentellen Teil der IHC führten Amelie Lupp und Elisa Neubauer durch. Stefan Schulz stellte hierfür die Antikörper zur Verfügung. Die Durchführung der qRT-PCR fand unter der Leitung von Ralph M. Wirtz durch Elisa Neubauer in Köln statt. Die Zusammenfassung der klinischen Daten wurde durch Daniel Kämmerer und Elisa Neubauer erstellt. Die Gesamdatenanalyse wurde von Elisa Neubauer ausgeführt. Das finale Manuskript hat Elisa Neubauer unter der Leitung und Unterstützung von Amelie Lupp geschrieben. Daniel Kämmerer und Jörg Sänger standen bei der Manuskripterstellung beratend zur Seite.

---

## Zusammenfassung

Für die immunhistochemische Evaluierung von Somatostatinrezeptoren gibt es in der Routinopathologie bisher kein einheitliches Auswertungssystem. Auch aus den vielen Publikationen zur SSTR-Evaluierung in verschiedensten Malignitäten kann man ableiten, dass diverse Scores neu entwickelt oder modifiziert wurden, um sie somit an die jeweilige Fragestellung anzupassen. Da die SSTR-Expression aber sehr heterogen ausgeprägt ist, können verschiedene Auswertungsmethoden zu stark variierenden Ergebnissen führen. Die Bestimmung von SSTR in der histopathologischen Diagnostik von NEN ist jedoch sehr entscheidend für eine adaptierte Bildgebung oder Therapie mit SSA (Auswahl des richtigen SSA), weshalb die Standardisierung der immunhistochemischen SSTR-Evaluierung an Bedeutung gewinnt. Aus diesem Grund wurden im **Manuskript II** drei in der SSTR-Auswertung häufig verwendete immunhistochemische Scoring-Systeme miteinander verglichen und deren Vor- und Nachteile betrachtet. Als Proben hierfür dienten die FFPE des gleichen Patientenkollektives der vorherigen Studie, die mittels Immunhistochemie und qRT-PCR analysiert wurden. Das abschließende Ergebnis dieser Untersuchung ist, dass alle drei Scores für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen aller fünf SSTR geeignet sind und die Ergebnisse gut miteinander korrelieren, der Immunreaktive Score jedoch eine gewisse Überlegenheit zeigte: Er liefert aussagekräftige Ergebnisse zur Färbeintensität bezogen auf den Prozentsatz positiver Zellen und bleibt dabei in der Auswertung am meisten praktikabel. Seine ermittelten Werte ergaben die höchsten Korrelationen zu den entsprechenden mRNA-Werten der benachbarten FFPE-Schnitte.



## Comparison of immunoreactive score, HER2/*neu* score and H score for the immunohistochemical evaluation of somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms

Elisa Specht, Daniel Kaemmerer,<sup>1</sup> Jörg Sängers,<sup>2</sup> Ralph M Wirtz,<sup>3</sup> Stefan Schulz & Amelie Lupp

Institute of Pharmacology and Toxicology, Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Jena, Germany.

<sup>1</sup>Department of General and Visceral Surgery, Zentralklinik Bad Berka, Bad Berka, Germany, <sup>2</sup>Laboratory of Pathology and Cytology, Bad Berka, Germany, and <sup>3</sup>STRATIFYER Molecular Pathology GmbH, Köln, Germany

Date of submission 8 July 2014

Accepted for publication 28 January 2015

Published online Article Accepted 1 February 2015

Specht E, Kaemmerer D, Sängers J, Wirtz R M, Schulz S & Lupp A.

(2015) *Histopathology* DOI: 10.1111/his.12662

**Comparison of IRS, HER2/*neu* score and H score for the immunohistochemical evaluation of somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms.**

**Aims:** Due to the growing number of somatostatin receptor (SSTR) targeting analogues and radioligands used for the diagnosis and therapy of neuroendocrine neoplasms (NEN), the assessment of SSTR subtype status has increasingly gained predictive value. In pathology, the SSTR protein levels are detected routinely by immunohistochemistry (IHC); however, a lack of a standardized evaluation system persists. Thus, in the present investigation, three well-established semi-quantitative scoring systems [immunoreactive score (IRS), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)/*neu* score, H score] used commonly for SSTR-IHC evaluation in NEN were compared.

**Methods and results:** A total of 240 formalin-fixed, paraffin-embedded tumour samples from 90 patients

with bronchopulmonary NEN were examined by IHC and quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT–PCR) for SSTR1, 2A, 3, 4 and 5 expression. Using both methods, SSTR1, 2A and 5 were the most frequently expressed subtypes. For all SSTR subtypes, all three scores correlated well with each other and with qRT–PCR data. However, the IRS was the most meaningful score with the best correlation to mRNA levels.

**Conclusions:** Because a unified IHC scoring system for SSTR analysis is needed urgently to optimize the theranostics of NEN, among the scores tested, the IRS seems to be the most suitable according to our results. It provides sufficient accuracy combined with high practicability.

**Keywords:** H score, HER2/*neu* score, immunohistochemistry, immunoreactive score, lung, neuroendocrine tumours, receptors/somatostatin

Address for correspondence: E Specht, Institute of Pharmacology and Toxicology, Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Drackendorfer Strasse 1, 07747 Jena, Germany. e-mail: elisa.specht@med.uni-jena.de

### Introduction

Somatostatin receptors (SSTR) are known for their overexpression in neuroendocrine neoplasms (NEN) and thus have gained high importance for the diagnosis and treatment of this tumour type. SSTR comprise a family of five G-protein-coupled receptor

subtypes, namely SSTR1, 2, 3, 4 and 5, with SSTR2 existing as two splice variants: the unspliced SSTR2A and spliced SSTR2B, the presence of which in man has been discussed controversially.<sup>1–3</sup>

Numerous studies exist regarding the SSTR status of gastroenteropancreatic NEN (GEP-NEN) and high levels of SSTR2A with positivity in more than 80% of patients have been observed. The latter finding further advances diagnostic and therapeutic interventions, with *in-vivo* imaging methods using radiolabelled somatostatin analogues (SA) playing an important role [SSTR scintigraphy, SSTR-positron emission tomography-computed tomography (PET/CT)].<sup>4–11</sup> However, SSTR positivity can also result in an adapted therapy with SA or, particularly in metastatic disease, in peptide receptor radionuclide therapy.<sup>11–14</sup>

For all these interventions, however, no clear-cut evidence remains with respect to their use in NEN of the bronchial tree, because there is a lack of extensive studies concerning the SSTR expression status in bronchopulmonary NEN (BP-NEN).<sup>15</sup> This heterogeneous tumour group comprises the well-differentiated typical carcinoids (TC), intermediate-differentiated atypical carcinoids (AC), poorly differentiated small-cell lung cancers (SCLC) and large-cell neuroendocrine carcinomas.<sup>16–18</sup>

To investigate the SSTR expression rate, different methods can be considered. Northern blotting, *in-situ* hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) detect the mRNA levels of SSTR; however, Western blotting and immunohistochemistry (IHC) recognize SSTR expression on the protein level, and seem to be more reasonable for subsequent diagnosis and treatment modalities. IHC is a reproducible method that could be performed in laboratories worldwide with a convenient cost-benefit ratio. One can work with archived material and determine the localization of the expression with commercially available antibodies for all SSTR subtypes. Pre-operatively, biopsy material can be investigated, and subsequent clinical procedures selected. Thus far, different semiquantitative scoring systems exist that are defined mainly by the authors themselves, thus resulting in poor interlaboratory comparability.<sup>19–24</sup> One score that is well established but hardly used is the immunoreactive score (IRS) according to Remmele and Stegner,<sup>25</sup> which was first developed for the IHC evaluation of oestrogen and progesterone receptors in mammary carcinoma, but also gained importance in the evaluation of NEN.<sup>4</sup> The human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)/*neu* score was developed by DakoCytomation (Glostrup, Denmark) in conjunction

with the HercepTest™ (DakoCytomation) to standardize the routine histopathological evaluation of HER expression in breast cancer.<sup>1,2,26</sup> Because of the membranous staining of both HER2 and SSTR2A, this scoring system was also used for SSTR assessment and is employed additionally for the examination of the cytoplasmic staining of SSTR1, 3, 4 and 5.<sup>27,28</sup> Some investigators have used the hormone receptor score (H score) as a semiquantitative evaluation system for the degree of immunohistochemical SSTR expression.<sup>24,29</sup> This score was first mentioned in 2003, when Hirsch *et al.* used it to evaluate epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in non-small-cell lung cancer (non-SCLC). Therefore, it is also called the EGFR score.<sup>20,30</sup>

Because of the heterogeneity of the scores used at present, there is still a need for a standardized evaluation system for the immunohistochemical investigation of SSTR expression. Thus, the aim of our work was to evaluate immunohistochemical SSTR expression in BP-NEN using the aforementioned three different scoring systems (IRS, HER2/*neu* score, H score). We compared the three IHC scores with each other and with real-time RT-PCR analysis of adjacent paraffin sections for all five SSTR subtypes to guide the development of a uniform and standardized IHC-SSTR evaluation system.

## Methods

### PATIENTS

A total of 240 formalin-fixed, paraffin-embedded tumour samples (FFPE) were provided by the Department of Pathology, Bad Berka (Germany). They were derived from 90 patients, from whom 26 had the diagnosis of a TC, 30 of an AC and 34 of a SCLC. All tumours were verified histologically by two independent pathologists according to the World Health Organization and Union for International Cancer Control criteria. The sample material comprised surgical specimens only (mainly tumour resections, some biopsies) and there were no different time-points in sampling. Dependent upon the tumour size, large primary tumours were divided into two or three parts and embedded as separate paraffin blocks. In the case of multifocal metastases (e.g. lymph node metastases), different FFPE from the same patient were obtained. Thus, the number of samples varied from 1 to 16 FFPE per patient. In this cohort, two patients are known to have extrapulmonary metastases (one AC patient: liver metastasis; one SCLC patient: thyroid metastasis). In no case was paired primary tumour

and metastasis available. Only two of the patients had been staged by a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC PET/CT prior to surgery. A positive vote from the Ethics Committee of the state of Thuringia was gained for this retrospective analysis.

#### IMMUNOHISTOCHEMISTRY

From each FFPE, 4- $\mu\text{m}$  sections were cut and floated onto positively charged slides. The IHC was performed by an avidin–biotin–peroxidase complex (ABC) method, as described previously.<sup>31</sup> The slices were incubated overnight at 4°C with specific rabbit antibodies against the C-terminal tail of the different SSTR subtypes. Detailed information on the anti-SSTR-antibodies is summarized in Figure 1.

Detection of the primary antibodies was visualized using 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) in acetate buffer (BioGenex, San Ramon, CA, USA). Sections were then rinsed, counterstained with Mayer's haematoxylin and mounted in Vectamount™ mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). For immunohistochemical controls, the SSTR antibodies were adsorbed for 2 h at room temperature with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of the peptide used for the immunizations (Figure 1).

#### IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION

The IRS, based on the modification of McCarty *et al.*,<sup>32</sup> is determined by multiplying the staining intensity in four gradations with the percentage of positive cells in five gradations.<sup>25</sup> A mean was calculated between all staining intensities of one FFPE. Thus, a score from 0 to 12 points is obtained

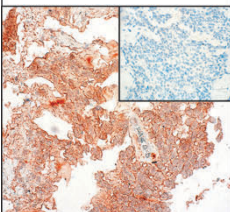
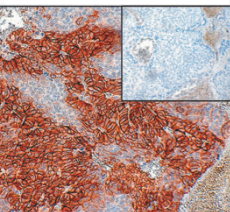
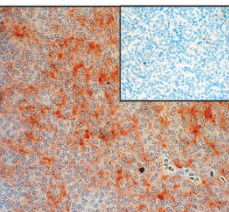
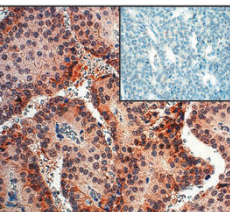
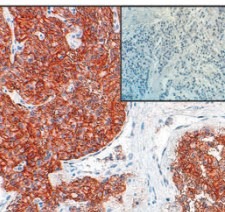
(Figure 2B). Samples having values  $\geq 3$  IRS points were considered positive. The HER2/*neu* score is based on a four-point classification, which is formed by the percentage of positive cells, the staining pattern and intensity (Figure 2A). Tumours with a HER2/*neu* score of 2+ or 3+ were considered positive.

The H score is calculated by adding the multiplication of the different staining intensities in four gradations with each percentage of positive cells (Figure 2C). Finally, a score from 0 to 300 points is obtained. A tumour sample having an H score  $\geq 50$  points was considered positive. IRS and H score were subclassified into a four-point system to allow for a better comparison with the other scoring systems.

All 240 FFPE were evaluated by means of these three scoring systems. If more than one FFPE from a patient was present, the arithmetic mean and the standard deviation were calculated of all FFPEs available for this patient. Due to staining errors, four of the 90 patients had to be excluded from the SSTR3 evaluation.

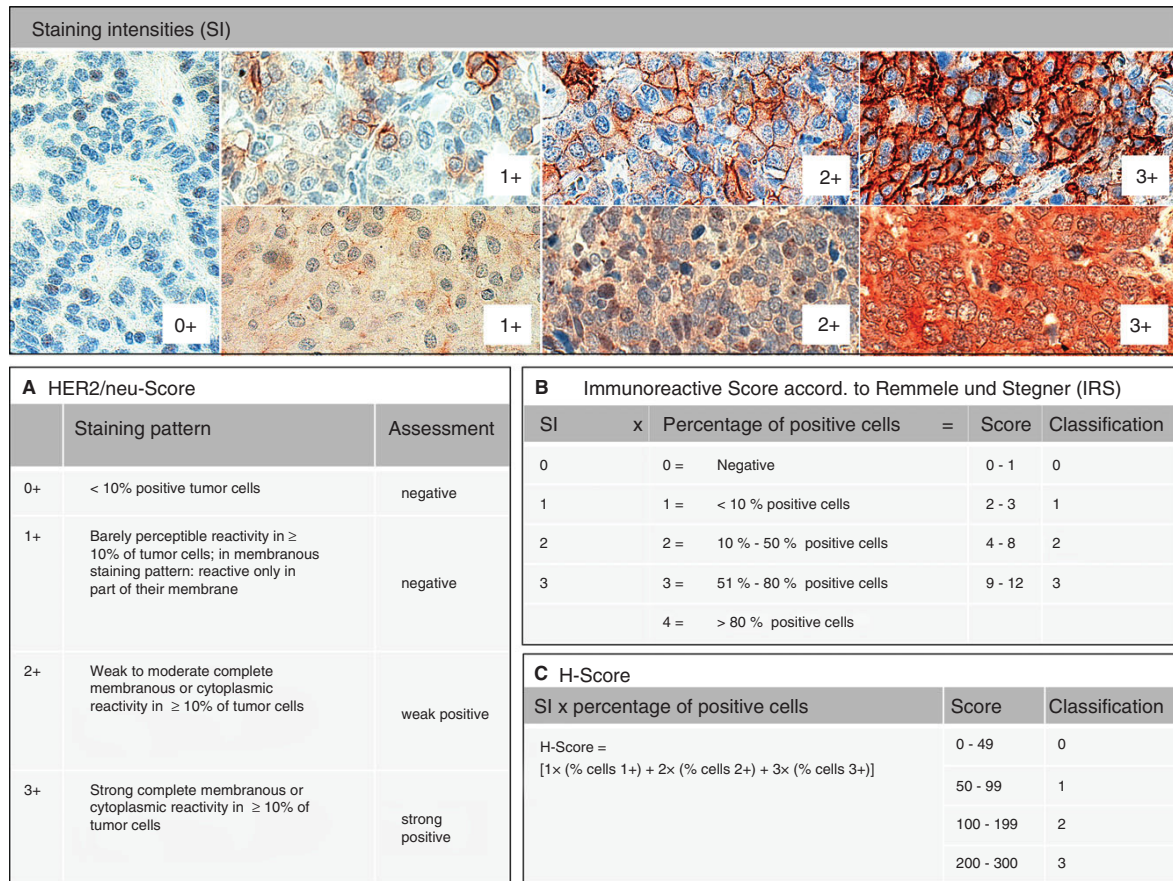
#### REAL-TIME RT-PCR

In cooperation with STRATIFYER Molecular Pathology, Cologne, Germany, adjacent sections of the immunohistochemical slides from each 20 TC, AC and SCLC were purified fully automatically to measure the mRNA and thus detect SSTR expression at the transcriptional level. Sufficient mRNA was isolated from FFPE specimens using a standardized isolation method, based on magnetic beads [Extraction-XL (96) RNA 2.0 kit; STRATIFYER Molecular Pathology, Köln, Germany], as described previously.<sup>33</sup>

SSTR1	SSTR2A	SSTR3	SSTR4	SSTR5
				
UMB-7 Rabbit monoclonal - Hybridoma culture supernatant 1:30 Epitomics (Burlingame, CA, USA)	UMB-1 Rabbit monoclonal - Hybridoma culture supernatant 1:10 Epitomics (Burlingame, CA, USA)	UMB-5 Rabbit monoclonal - Hybridoma culture supernatant 1:20 Epitomics (Burlingame, CA, USA)	4802 Rabbit polyclonal - Affinity-purified Serum 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gramsch Laboratories (Schwabhausen, GER)	UMB-4 Rabbit monoclonal - Hybridoma culture supernatant 1:10 Epitomics (Burlingame, CA, USA)

**Figure 1.** Expression pattern and peptide neutralization of the five somatostatin receptor (SSTR) antibodies.





**Figure 2.** Overview of the applied immunohistochemical scoring systems. The staining intensities are shown above (0+, 1+, 2+, 3+), with an example each for a membranous and for a cytoplasmic staining pattern. The calculation methods for the three different scores are shown in the tables below (A–C).

Directly after extraction, multiplex TaqMan<sup>TM</sup>-real-time PCR was performed fully automated using the SuperScript<sup>®</sup> III Platinum<sup>®</sup> One-Step real-time RT-PCR kit and the Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Primers and probes for the SSTR subtypes were designed by STRATIFYER Molecular Pathology and prepared by Eurogentec (Seraing, Belgium). The housekeeping gene calmodulin 2 (CALM2) was used as a control. Additionally, a no-template control (NTC) and a human reference RNA (QRef; Agilent Technologies, Rödermark, Germany) were analysed in parallel. Measurements were conducted on a Mx3005P device using the MxPro version 4.10d software (Agilent Technologies, Rödermark, Germany). After 40 cycles [50 min at 30°C, 2 min at 95°C (15 s at 95°C, 45 s at 60°C)  $\times$  40], a logarithmic analysis at a threshold of 50 was conducted.

#### EVALUATION OF THE REAL-TIME RT-PCR

The values measured were normalized by taking the difference between the Ct-value of the SSTR subtype and the Ct-value of CALM2 subtracted by the maximum number of PCR cycles {dCt(norm) = 40 –  $\Delta$ Ct [Ct(SSTR) – Ct(CALM2)]}. Thus, dCt-values  $\geq 19.00$  were obtained and, as in the IHC, a four-point classification was established (dCt-values: <23.78 = 0; 23.78 – 28.55 = 1; 28.56 – 33.33 = 2; >33.33 = 3). DCt-values  $\geq 27.00$  were classified as positive.

#### STATISTICS

For statistical analysis, the program IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics version 20.0.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) was used. According to the Kolmogorov–Smirnov

test the parameters were not distributed normally. Therefore, Kendall's Tau b and Spearman's rank correlation were performed as statistical tests. *P*-values <0.05 were considered significant and *P*-values <0.01 highly significant.

## Results

### SSTR DISTRIBUTION

The positivity of all the BP-NEN for the SSTR as evaluated by the IRS is shown in Table 1. Here, the TC and AC samples were mainly positive for the SSTR1, SSTR2A and SSTR5. According to the IRS only 14.7% of the SCLC (five of 34) expressed the SSTR1, whereas 47.1% (16 of 34) of the tumours were positive for the SSTR2A and 29.4% (10 of 34) for the SSTR5.

The SSTR expression rate of all the BP-NEN as evaluated by the HER2/*neu* score is summarized in Table 1. Also, in TC and AC the SSTR1, the SSTR2A and the SSTR5 were detected most frequently with this score. With SCLC the highest expression rates were observed for the SSTR2A and the SSTR5.

The results obtained with the H score can be seen from Table 1. Here, most TC and AC were positive for the SSTR1 and the SSTR5, but high SSTR2A levels were also noted in these tumours. With regard to the SCLC, with this score a strong positivity was seen for the SSTR5 and the SSTR2A.

### INTRA-INDIVIDUAL STANDARD DEVIATION

More than one FFPE was available from 50 of 90 patients (one to 16 FFPE per patient). Because of the remarkable heterogeneous SSTR expression observed both in single patients and within the tumour samples, the intra-individual standard deviation (SD) for each SSTR subtype was calculated for every IHC score (Table 2). Here, in all three scores the SSTR2A showed the highest SD. This receptor subtype was either strongly or not expressed and a high intra-individual variability was observed. In the IRS and the H scores a relatively high SD was also seen with respect to SSTR5 and SSTR4 expression. Considering the wide range of the values in the H score, larger SD values in this scoring system are to be expected. Nevertheless, the relative proportions of the SD<sub>max</sub> values for the individual SSTR are comparable between the three scores.

### IRS VERSUS HER2/NEU SCORE VERSUS H SCORE

The three semi-quantitative IHC scores correlated highly significantly with each other. The strongest

correlations were observed between the HER2/*neu* score and the IRS classification. The lowest correlation was seen for the SSTR5, both between HER2/*neu* score and the H score classification and between the IRS classification and the H score classification (Table 3).

### IMMUNOHISTOCHEMICAL SCORES VERSUS REAL-TIME RT-PCR

The best correlations with the real-time RT-PCR data were seen for the IRS classification. Here, the SSTR1, the SSTR2A and the SSTR5 expression data correlated significantly between both methods. Regarding the H score classification and the HER2/*neu* score, the SSTR1 and SSTR2A correlated significantly with the respective PCR data. With the HER2/*neu* score a tendency towards a correlation between both methods was observed for the SSTR5 (Table 4).

## Discussion

At present, no uniform immunohistochemical evaluation system for SSTR in NEN exists in the literature.<sup>19–24</sup> However, because of the development of new SA and radiopeptides that target additional SSTR subtypes compared with conventional SA (targeting particularly SSTR2A only), SSTR subtype assessment becomes increasingly important. Thus, the aim of the present study was to compare three well-established scoring systems for the immunohistochemical investigation of SSTR expression in terms of the effort needed for their implementation and conformity.

All three scoring systems showed highly significant correlations with each other. The largest discrepancies were noted for SSTR5 expression, particularly when comparing the IRS classification with the H score classification.

In a study by Kaemmerer *et al.*,<sup>4</sup> the SSTR subtype expression in a series of 21 GEP-NEN patients was evaluated by the IRS classification and compared with the HER2/*neu* score. Here, the same highly significant correlations for each SSTR subtype between the two scoring systems were detected as in the present study.

Compared with the HER2/*neu* score, the advantages of IRS lie in the integration of the percentages of the various staining intensities in the calculation, resulting in a more accurate determination of receptor expression. Because only SSTR2A is expressed exclusively as a membrane-bound receptor, characterization of the other SSTR subtypes by the HER2/*neu* score

**Table 1.** Somatostatin receptor (SSTR) expression in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms (BP-NEN) according to the three immunohistochemical scoring systems and to the real-time reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR). Data are given as percentage of positive cases (number of positive cases/total number of cases)

	All BP-NEN	TC	AC	SCLC
Immunoreactive score				
SSTR1	50.0 (45/90)	76.9 (20/26)	66.7 (20/30)	14.7 (5/34)
SSTR2A	44.4 (40/90)	42.3 (11/26)	43.3 (13/30)	47.1 (16/34)
SSTR3	4.7 (4/86)	0.0 (0/24)	3.3 (1/30)	9.4 (3/32)
SSTR4	15.6 (14/90)	19.2 (5/26)	10.0 (3/30)	17.6 (6/34)
SSTR5	43.3 (39/90)	42.3 (11/26)	60.0 (18/30)	29.4 (10/34)
HER2/ <i>neu</i> score				
SSTR1	35.6 (32/90)	69.2 (18/26)	36.7 (11/30)	8.8 (3/34)
SSTR2A	40.0 (36/90)	42.3 (11/26)	33.3 (10/30)	44.1 (15/34)
SSTR3	3.5 (3/86)	0.0 (0/24)	3.3 (1/30)	6.3 (2/32)
SSTR4	6.7 (6/90)	11.5 (3/26)	3.3 (1/30)	5.9 (2/34)
SSTR5	32.2 (29/90)	34.6 (9/26)	40.0 (12/30)	23.5 (8/34)
H-score				
SSTR1	57.8 (52/90)	76.9 (20/26)	76.7 (23/30)	26.5 (9/34)
SSTR2A	44.4 (40/90)	42.3 (11/26)	36.7 (11/30)	52.9 (18/34)
SSTR3	3.5 (3/86)	0.0 (0/24)	3.3 (1/30)	6.3 (2/32)
SSTR4	14.4 (13/90)	19.2 (5/26)	6.7 (2/30)	17.6 (6/34)
SSTR5	76.7 (69/90)	76.9 (20/26)	76.7 (23/30)	76.5 (26/34)
Real-time RT–PCR				
SSTR1	40.0 (24/60)	50.0 (10/20)	65.0 (13/20)	5.0 (1/20)
SSTR2A	45.0 (27/60)	40.0 (8/20)	45.0 (9/20)	50.0 (10/20)
SSTR3	0.0 (0/60)	0.0 (0/20)	0.0 (0/20)	0.0 (0/20)
SSTR4	13.3 (8/60)	5.0 (1/20)	25.0 (5/20)	10.0 (2/20)
SSTR5	55.5 (33/60)	60.0 (12/20)	65.0 (13/20)	40.0 (8/20)

AC, Atypical carcinoids; TC, Typical carcinoids; SCLC, Small cell lung cancers; HER2, Human epidermal growth factor receptor 2.

is ambiguous, because the assignment of immunostaining of the tumour slides to the four gradations of the HER2/*neu* score is extremely difficult. We had to adapt the conditions of this scoring system for cytoplasmic staining, which was developed originally for membranous staining, as shown in Figure 2A. In Schmid *et al.*<sup>29</sup> and Tsuta *et al.*,<sup>24</sup> the immunohistochemical SSTR determination was evaluated using the H

score. This new score is more detailed than the IRS by weighting the percentages of the stained areas together with the intensity, which leads ultimately to a result from 0 to 300 points. It is true that with this instrument a more granular characterization of the receptor expression level can be achieved than with the other scores; however, with the H score, the relative error increases as the subjectively influenced

**Table 2.** Intra-individual standard deviations of the somatostatin receptor (SSTR) expression as obtained from the different scoring systems. Data are given as number (%) of cases

	Standard deviation (SD) IRS ( <i>n</i> = 50)					SD <sub>max</sub>
	0.00	0.01–1.00	1.01–3.00	3.01–5.00	>5.01	
SSTR1	17 (34.0)	14 (28.0)	19 (38.0)	–	–	2.89
SSTR2A	24 (48.0)	11 (22.0)	10 (20.0)	3 (6.0)	2 (4.0)	6.65
SSTR3	28 (56.0)	17 (34.0)	5 (10.0)	–	–	3.00
SSTR4	35 (70.0)	5 (10.0)	8 (16.0)	2 (4.0)	–	3.46
SSTR5	17 (34.0)	8 (16.0)	23 (46.0)	2 (4.0)	–	3.42

	Standard deviation HER2/ <i>neu</i> score ( <i>n</i> = 50)			SD <sub>max</sub>
	0.00	0.01–1.00	1.01–2.00	
SSTR1	33 (66.0)	16 (32.0)	1 (2.0)	1.15
SSTR2A	38 (76.0)	7 (14.0)	5 (10.0)	1.73
SSTR3	34 (68.0)	15 (30.0)	1 (2.0)	1.10
SSTR4	36 (72.0)	12 (24.0)	2 (4.0)	1.41
SSTR5	28 (56.0)	21 (42.0)	1 (2.0)	1.15

	Standard deviation H-score ( <i>n</i> = 50)						SD <sub>max</sub>
	0.00	0.01–5.00	5.01–15.00	15.01–30.00	30.01–60.00	>60.00	
SSTR1	12 (24.0)	3 (6.0)	14 (28.0)	9 (18.0)	10 (20.0)	2 (4.0)	70.00
SSTR2A	12 (24.0)	14 (28.0)	7 (14.0)	8 (16.0)	5 (10.0)	4 (8.0)	146.59
SSTR3	27 (54.0)	9 (18.0)	9 (18.0)	2 (4.0)	3 (6.0)	–	47.51
SSTR4	33 (66.0)	2 (4.0)	4 (8.0)	6 (12.0)	3 (6.0)	2 (4.0)	81.32
SSTR5	10 (20.0)	4 (8.0)	8 (16.0)	11 (22.0)	15 (30.0)	2 (4.0)	80.31

IRS, Immunoreactive score; HER2, Human epidermal growth factor receptor 2.

**Table 3.** Kendall's Tau-b correlation between the three immunohistochemical scoring systems

	Test	SSTR1	SSTR2A	SSTR3	SSTR4	SSTR5
HER2/ <i>neu</i> score versus IRS classification	Kendall's Tau-b ( $\tau$ )	0.881	0.939	0.747	0.846	0.815
	<i>P</i> -value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
HER2/ <i>neu</i> score versus H-score classification	Kendall's Tau-b ( $\tau$ )	0.839	0.660	0.489	0.770	0.441
	<i>P</i> -value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
IRS classification versus H-score classification	Kendall's Tau-b ( $\tau$ )	0.821	0.706	0.624	0.884	0.332
	<i>P</i> -value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

HER2, Human epidermal growth factor receptor 2; IRS, Immunoreactive score.

**Table 4.** Spearman's rank correlation of the IHC-score classifications and the polymerase chain reaction (PCR) classification

Variable versus covariable		IRS class versus PCR class		HER2/ <i>neu</i> versus PCR class		H-score class versus PCR-class	
	<i>n</i>	$\rho_{sp}$	<i>P</i> -value	$\rho_{sp}$	<i>P</i> -value	$\rho_{sp}$	<i>P</i> -value
SSTR							
SSTR1	60	0.498	<0.001	0.398	0.002	0.486	<0.001
SSTR2A	60	0.672	<0.001	0.699	<0.001	0.554	<0.001
SSTR3	58	-0.041	0.762	-0.064	0.634	-0.025	0.852
SSTR4	60	-0.025	0.848	-0.072	0.586	0.025	0.847
SSTR5	60	0.281	0.030	0.216	0.098	0.165	0.209

HER2, Human epidermal growth factor receptor 2; IHC, Immunohistochemistry.

immunohistochemical analysis certainly does not enable such an accurate estimation of percentages. The tumour slides are usually large (except biopsies) and, microscopically, a complete view is not possible.

Compared with the results of Tsuta *et al.*,<sup>24</sup> we determined higher SSTR5 levels in all BP-NEN. Possible reasons for the discrepancy between the study of Tsuta *et al.* and our findings can be attributed to (i) the use of tissue microarrays instead of whole tumour slides in the Tsuta *et al.*<sup>24</sup> study or (ii) the use of monoclonal anti-SSTR antibodies in the present study for the determination of SSTR1, 2A, 3 and 5 expression that have proved their specificity in different studies previously,<sup>1,2,26</sup> but only polyclonal antibodies in the Tsuta *et al.*<sup>24</sup> study. In our investigation, we have used two different and independent methods (IHC and qRT-PCR). Both methods produced the same results and showed a high correlation with each other.

The heterogeneous SSTR expression additionally complicates the accurate weighting of the percentages per staining intensity. Here, particularly high intra-individual standard deviations for the SSTR2A expression were observed in our investigations, as described previously for all SSTR subtypes.<sup>34–37</sup> Due to the practicability and sufficiently accurate evaluation of the staining intensity and percentage of stained areas, the IRS appears to be the most adequate scoring system. Finally, Kaemmerer *et al.*<sup>4</sup> found that, for the IRS, but not for the HER2/*neu* score, significant positive correlations were found between SSTR2A IHC and the SUV<sub>max</sub> (maximum standardized uptake value) of the corresponding <sup>68</sup>Ga-DOTA-NOC PET/CT. In the present study, the best correlations with real-time RT-PCR were obtained for IRS. Thus, in our group, the immunohistochemical evaluation of SSTR was performed concurrently using IRS and the HER2/*neu* score. To enable the direct comparison

between these two scoring systems, the IRS was subclassified further according to Kaemmerer *et al.*<sup>4</sup> The H score was introduced recently as an additional scoring system for the evaluation of immunohistochemical SSTR expression. Therefore, in the present study, we sought to compare all three scoring systems which are used commonly for the assessment of the SSTR expression, both among each other and with the corresponding PCR data. For subclassification of the H score and PCR data, we first tried different limits and finally came up with the limits depicted in Figure 2C and mentioned in the Methods section (Evaluation of real-time RT-PCR) to produce the best results. In the present investigation, real-time RT-PCR, which was performed in the adjacent sections of the IHC staining, should serve as an additional and independent method to strengthen further the validity of the IHC investigation.

In summary, as the histopathological determination of the SSTR subtype distribution gains importance for the selection of the appropriate SA or SSTR-targeting radionuclide, a uniform evaluation system should be used for interlaboratory comparability. In our opinion, the IRS meets these criteria most effectively, because it considers the percentage of different staining intensities but remains practicable.

## Acknowledgements

We thank Mrs Manal Sayeg for assistance with sample compilation. This study was supported financially by the Theranostics-Research Center Zentralklinik, Bad Berka, Germany.

## Conflicts of interest

The authors have no potential conflicts of interest.



## References

1. Fischer T, Doll C, Jacobs S, Kolodziej A, Stumm R, Schulz S. Reassessment of SST2 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008; **93**: 4519–4524.
2. Lupp A, Nagel F, Doll C *et al.* Reassessment of SST3 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-5. *Neuroendocrinology* 2012; **96**: 301–310.
3. Taniyama Y, Suzuki T, Mikami Y, Moriya T, Satomi S, Sasano H. Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study. *Endocr. J.* 2005; **52**: 605–611.
4. Kaemmerer D, Peter L, Lupp A *et al.* Comparing of IRS and HER2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2012; **5**: 187–194.
5. Papotti M, Bongiovanni M, Volante M *et al.* Expression of somatostatin receptor types 1–5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Virchows Arch.* 2002; **440**: 461–475.
6. O'Toole D, Saveanu A, Couvelard A *et al.* The analysis of quantitative expression of somatostatin and dopamine receptors in gastro-entero-pancreatic tumours opens new therapeutic strategies. *Eur. J. Endocrinol.* 2006; **155**: 849–857.
7. Reubi JC, Waser B, Schmassmann A, Laissue JA. Receptor autoradiographic evaluation of cholecystokinin, neurotensin, somatostatin and vasoactive intestinal peptide receptors in gastro-intestinal adenocarcinoma samples: where are they really located? *Int. J. Cancer* 1999; **81**: 376–386.
8. Lamberts SW, Hofland LJ, Nobels FR. Neuroendocrine tumor markers. *Front. Neuroendocrinol.* 2001; **22**: 309–339.
9. Baum RP, Kulkarni HR. Theranostics: from molecular imaging using GA-68 labeled tracers and pet/ct to personalized radionuclide therapy – the Bad Berka experience. *Theranostics* 2012; **2**: 437–447.
10. Baum RP, Kulkarni HR, Carreras C. Peptides and receptors in image-guided therapy: theranostics for neuroendocrine neoplasms. *Semin. Nucl. Med.* 2012; **42**: 190–207.
11. Feelders RA, Hofland LJ, Kwekkeboom DJ, Lamberts S, de Herder WW. Chapter 35. Neuroendocrine tumors. In Fink G, Pfaff DW, Levine JE eds. *Handbook of neuroendocrinology*. San Diego: Academic Press, 2012; 761–778.
12. Offermanns S, Rosenthal W. *Encyclopedia of molecular pharmacology*. Berlin: Springer, 2008; 1147–1152.
13. Pavel M, Kidd M, Modlin I. Systemic therapeutic options for carcinoid. *Semin. Oncol.* 2013; **40**: 84–99.
14. Toumpanakis C, Caplin ME. Update on the role of somatostatin analogs for the treatment of patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Semin. Oncol.* 2013; **40**: 56–68.
15. Hörsch D, Sayeg Y, Bonnet R, Kaemmerer D, Presselt N, Baum RP. [Expert dialogue: neuroendocrine tumours of the lungs and gastroenteropancreatic system]. *Pneumologie* 2012; **66**: 44–48.
16. Bertino EM, Confer PD, Colonna JE, Ross P, Otterson GA. Pulmonary neuroendocrine/carcinoid tumors: a review article. *Cancer* 2009; **115**: 4434–4441.
17. Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malfetherthner MV, Modlin IM. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer* 2008; **113**: 5–21.
18. Siddiqui MT. Pulmonary neuroendocrine neoplasms: a review of clinicopathologic and cytologic features. *Diagn. Cytopathol.* 2010; **38**: 607–617.
19. Papotti M, Croce S, Macri L *et al.* Correlative immunohistochemical and reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of somatostatin receptor type 2 in neuroendocrine tumors of the lung. *Diagn. Mol. Pathol.* 2000; **9**: 47–57.
20. Volante M, Brizzi MP, Faggiano A *et al.* Somatostatin receptor type 2a immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod. Pathol.* 2007; **20**: 1172–1182.
21. Corleto VD, Falconi M, Panzuto F *et al.* Somatostatin receptor subtypes 2 and 5 are associated with better survival in well-differentiated endocrine carcinomas. *Neuroendocrinology* 2009; **89**: 223–230.
22. Miederer M, Seidl S, Buck A *et al.* Correlation of immunohistochemical expression of somatostatin receptor 2 with standardised uptake values in 68Ga-DOTATOC PET/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2009; **36**: 48–52.
23. Zamora V, Cabanne A, Salanova R *et al.* Immunohistochemical expression of somatostatin receptors in digestive endocrine tumours. *Dig. Liver Dis.* 2010; **42**: 220–225.
24. Tsuta K, Wistuba II, Moran CA. Differential expression of somatostatin receptors 1–5 in neuroendocrine carcinoma of the lung. *Pathol. Res. Pract.* 2012; **208**: 470–474.
25. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Der Pathol.* 1987; **8**: 138–140.
26. Lupp A, Hunder A, Petrich A, Nagel F, Doll C, Schulz S. Reassessment of SST(5) somatostatin receptor expression in normal and neoplastic human tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-4. *Neuroendocrinology* 2011; **94**: 255–264.
27. Hsu CY, Ho DM, Yang CF, Lai CR, Yu IT, Chiang H. Interobserver reproducibility of HER-2/*neu* protein overexpression in invasive breast carcinoma using the Dako Herceptest. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002; **118**: 693–698.
28. Lacroix-Triki M, Mathoulin-Pelissier S, Ghnassia JP *et al.* High inter-observer agreement in immunohistochemical evaluation of HER-2/*neu* expression in breast cancer: a multicentre GEP-PICS study. *Eur. J. Cancer* 2006; **42**: 2946–2953.
29. Schmid HA, Lambertini C, van Vugt HH *et al.* Monoclonal antibodies against the human somatostatin receptor subtypes 1–5: development and immunohistochemical application in neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 2012; **95**: 232–247.
30. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr *et al.* Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J. Clin. Oncol.* 2003; **21**: 3798–3807.
31. Lupp A, Danz M, Muller D. Morphology and cytochrome p450 isoforms expression in precision-cut rat liver slices. *Toxicology* 2001; **161**: 53–66.
32. McCarty KS Jr, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1985; **109**: 716–721.
33. Pentheroudakis G, Batistatou A, Kalogeras KT *et al.* Prognostic utility of beta-tubulin isotype III and correlations with other molecular and clinicopathological variables in patients with early breast cancer: a translational Hellenic Cooperative Oncology Group (HECOG) Study. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011; **127**: 179–193.

10 E Specht *et al.*

34. Kulaksiz H, Eissele R, Rossler D *et al.* Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2a, 3, and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. *Gut* 2002; **50**: 52–60.
35. Mizutani G, Nakanishi Y, Watanabe N *et al.* Expression of somatostatin receptor (SSTR) subtypes (SSTR-1, 2a, 3, 4 and 5) in neuroendocrine tumors using real-time RT–PCR method and immunohistochemistry. *Acta Histochem. Cytochem.* 2012; **45**: 167–176.
36. Pelosi G, Volante M, Papotti M, Sonzogni A, Masullo M, Viale G. Peptide receptors in neuroendocrine tumors of the lung as potential tools for radionuclide diagnosis and therapy. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2006; **50**: 272–287.
37. Volante M, Rosas R, Allia E *et al.* Somatostatin, cortistatin and their receptors in tumours. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2008; **286**: 219–229.

### 4.3 Manuskript III

## **Comparative Evaluation of Three Proliferation Markers, Ki-67, TOP2A, and RacGAP1, in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms: Issues and Prospects**

---

(2016) Oncotarget, May 2016, DOI:10.18632/oncotarget.9747

Elisa Neubauer, Ralph M. Wirtz, Daniel Kaemmerer, Maria Athelougou, Lydia Schmidt, Jörg Säger, Amelie Lupp

*eingereicht am 13. März 2016*

*angenommen am 16. Mai 2016*

*online publiziert am 31. Mai 2016*

### **Autorenschaft**

Erstautor

### **Beitrag der Autoren**

An der Studienplanung waren Amelie Lupp, Daniel Kämmerer, Ralph Wirtz und Elisa Neubauer beteiligt. Die praktische Durchführung der IHC wurde durch Amelie Lupp und Elisa Neubauer ausgeführt. Dabei war Lydia Schmidt an der Probenauswahl und -aufbereitung der SCLC mit guter Prognose beteiligt und die Zweitauswerterin der manuell-visuellen Auswertung der gesamten SCLC im Untersucher-Vergleich. Die automatisierte IHC-Auswertung erfolgte durch Maria Athelougou in München. Unter der Aufsicht von Ralph M. Wirtz führte Elisa Neubauer die qRT-PCR in Köln durch. Die Gesamtdatenanalyse wurde schließlich von Elisa Neubauer ausgeführt. Das finale Manuskript hat Elisa Neubauer unter der Leitung und Unterstützung von Amelie Lupp geschrieben. Bei pathologischen Fragestellungen standen dabei Jörg Säger und bei jeglichen klinischen Fragestellungen Daniel Kämmerer zur Seite.

## Zusammenfassung

Das Grading und die Klassifikation der bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien werden derzeit gemäß der aktuellen WHO- und IASLC-Kriterien aus der Kombination der Anzahl der Mitosen in zehn HPF und dem Ausmaß an nekrotischen Arealen ermittelt. Da dieser Prozess sehr zeitintensiv und erheblich Untersucher-abhängig ist, wird als mögliche Alternative hierfür die Eignung des Ki-67-Labeling-Indexes diskutiert. Um einen Beitrag zur aktuellen Kontroverse zu leisten, wurden FFPE eines großen Kollektives von 104 BP-NEN-Patienten (24 TC, 21 AC, 52 SCLC (28 mit guter und 21 mit schlechter Prognose; cut-off: Überleben  $< / \geq$  30 Monate nach Diagnose) und 7 LCNEC) mittels verschiedener immunhistochemischer Auswertungsmethoden und einer qRT-PCR im **Manuskript III** analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die subjektiv beeinflussten manuell-visuellen IHC-Auswertungsverfahren derzeit noch der vollautomatisierten digitalen Bildauswertung überlegen sind. Für eine Festlegung sinnvoller Cut-off-Werte zwischen den Tumorentitäten wird jedoch eine Standardisierung der manuellen Auszählung durch den Pathologen notwendig. Eine bisher nicht betrachtete, aber dennoch sehr günstige Variante für die Klassifikation der BP-NEN stellt die Ermittlung der Ki-67-mRNA-Level dar.

Neben dem Ki-67 können auch das TOP2A und das RacGAP1 für das Grading und die Klassifikation der BP-NEN Verwendung finden. Ersteres hat den Vorteil, dass es hinsichtlich der Therapie, als Target von Anthrazyklinen und Topoisomerase-Inhibitoren, einen direkten prädiktiven Wert mit sich bringt. Beim RacGAP1 konnte festgestellt werden, dass es gegenüber den beiden anderen Markern eine noch bessere prognostische Aussage ermöglicht und aufgrund seiner vielfältigen Funktionen in der Tumor-Progression einen Marker mit großem Potential darstellt, der weiter erforscht werden sollte.

Die *Supplemental Data* des **Manuskriptes III** befinden sich im Anhang B).

## Comparative evaluation of three proliferation markers, Ki-67, TOP2A, and RacGAP1, in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms: Issues and prospects

Elisa Neubauer<sup>1</sup>, Ralph M. Wirtz<sup>2</sup>, Daniel Kaemmerer<sup>3</sup>, Maria Athelougou<sup>4</sup>, Lydia Schmidt<sup>1</sup>, Jörg Sängler<sup>5</sup>, Amelie Lupp<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pharmacology and Toxicology, Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Jena, Germany

<sup>2</sup>STRATIFYER Molecular Pathology GmbH Köln, Köln, Germany

<sup>3</sup>Department of General and Visceral Surgery, Zentralklinik Bad Berka, Bad Berka, Germany

<sup>4</sup>DEFINIENS AG, München, Germany

<sup>5</sup>Laboratory of Cytology and Pathology, Bad Berka, Germany

**Correspondence to:** Elisa Neubauer, **email:** elisa.specht@med.uni-jena.de

**Keywords:** Ki-67, Topoisomerase 2 alpha, RacGAP1, lung neuroendocrine neoplasms, IHC/RT-qPCR

**Received:** March 13, 2016

**Accepted:** May 16, 2016

**Published:** May 31, 2016

### ABSTRACT

The classification of bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms (BP-NEN) into four tumor entities (typical carcinoids (TC), atypical carcinoids (AC), small cell lung cancers (SCLC), large cell neuroendocrine lung carcinomas (LCNEC)) is difficult to perform accurately, but important for prognostic statements and therapeutic management decisions. In this regard, we compared the expression of three proliferation markers, Ki-67, Topoisomerase II alpha (TOP2A), and RacGAP1, in a series of tumor samples from 104 BP-NEN patients (24 TC, 21 AC, 52 SCLC, 7 LCNEC) using different evaluation methods (immunohistochemistry (IHC): Average evaluation, Hotspot evaluation, digital image analysis; RT-qPCR).

The results indicated that all three markers had increased protein and mRNA expression with poorer differentiation and correlated well with each other, as well as with grading, staging, and poor survival. Compared with Ki-67 and TOP2A, RacGAP1 allowed for a clearer prognostic statement. The cut-off limits obtained for Ki-67-Average (IHC) were TC-AC 1.5, AC-SCLC 19, and AC-LCNEC 23.5. The Hotspot evaluation generated equal to higher, the digital image analysis generally lower between-entity cut-off limits.

All three markers enabled a clear-cut differentiation between the BP-NEN entities, and all methods evaluated were suitable for marker assessment. However, to define optimal cut-off limits, the Ki-67 evaluation methods should be standardized. RacGAP1 appeared to be a new marker with great potential.

### INTRODUCTION

According to the National Cancer Institute and the World Health Organization (WHO), lung cancer is the most common death-causing cancer. This relationship is particularly true in the well-industrialized northern hemisphere, where lung cancer comprises 20–25% of the malignancies of neuroendocrine origin. The 2015 WHO classification system (first proposed in 1998 by Travis et al. [1]) classifies these bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms (BP-NEN) into the less aggressive, well-differentiated, and low-grade typical carcinoids (TC),

the intermediate-grade atypical carcinoids (AC), and the poorly-differentiated and aggressive large cell neuroendocrine lung carcinomas (LCNEC) and small cell lung cancers (SCLC) [1–5]. Correct diagnostic classification of these four tumor entities is of major clinical importance because the prognostic, diagnostic, and therapeutic consequences differ greatly between them. The current grading system for NEN of the lung and thymus is based on WHO and International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) criteria: The grade is mainly determined by counting the number of mitotic figures in 10 high-power fields (HPFs) in combination with the

presence or absence of necrosis [5, 6]. Counting mitoses is a very time-consuming process with a high inter-observer variability and cytomorphological overlap among the BP-NEN entities is not uncommon. An additional and reliable cut-off-marker is still needed to distinguish TC from AC and, more importantly, AC from SCLC/LCNEC, during development of a pathologic diagnosis [4, 7–9]. The Ki-67 labeling index was proposed for this purpose. The index was recently added to the 2010 WHO classification for tumor grading (Ki-67: G1:  $\leq 2\%$ ; G2: 3–20%; G3:  $> 20\%$ ) of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms (GEP-NEN). It has emerged as a gold standard and a predictor of prognosis. Index results are also used for patient management decisions, particularly when advanced disease is present [10, 11]. The clinical acceptance of Ki-67, when used for BP-NEN, is still increasing, and clinical use of Ki-67 is being discussed extensively in the literature. More comprehensive studies are needed for a complete integration of Ki-67 into the grading system of this tumor group [12]. A uniform evaluation system (manual counting, eyeballing, digital image analysis), inter-observer variability of manual immunohistochemical evaluation, and the correct cut-off values to distinguish the BP-NEN entities are issues for further study [8, 9, 12–14]. The 2015 WHO classification for pulmonary neuroendocrine tumors recommends only very rough Ki-67 limits (TC  $\leq 5\%$ , AC  $\leq 20\%$ , SCLC 50–100%, and LCNEC 40–80%) and calls for additional studies to generate more data [5].

We propose that Topoisomerase II alpha (TOP2A) is another proliferation marker that has potential to be used to distinguish BP-NEN entities. It is used to determine the proliferative tumor cell fraction in other tumor entities (e.g., breast cancer). The advantage of TOP2A compared with Ki-67 is related to its additional function as a predictive marker for subsequent therapies with topoisomerase inhibitors or anthracyclines [15, 16]. TOP2A used as a histopathologic marker for NEN entities has not been tested so far.

The Rac GTPase activating protein 1 (RacGAP1) is a previously unknown but very interesting proliferation marker; it is upregulated in many malignant tumors and is associated with a poor patient outcome [17–21]. This protein binds to the activated forms of RhoGTPases and induces GTP hydrolysis. It, thus, negatively regulates many Rho-mediated signals [21, 22]. Little is known about RacGAP1, except that it is involved in the cytokinesis, migration, cell motility, and transformation of tumor cells, and subsequent increased metastasis [21, 23–26]. The role of RacGAP1 in NEN and its clinical functions remain to be elucidated, but first study results suggest that it is correlated with Ki-67 expression [19]. In addition to allowing us to differentiate between the BP-NEN entities, TOP2A and RacGAP1 may provide new insights into the biological and molecular behavior of NEN.

The first aim of our study was to compare the current Ki-67 determination methods when used for BP-NEN

diagnosis. Two manual Ki-67 immunohistochemistry (IHC) evaluation methods were compared with a fully automated digital image analysis of the same slides and a real time RT-PCR of adjacent paraffin sections. The IHC inter-observer variability for the manual counting method was also evaluated. The second aim was to define Ki-67 cut-off values for the BP-NEN entities for each evaluation method. The Ki-67 protein and mRNA expression levels were then compared with those of TOP2A and RacGAP1. The suitability of the three proliferation markers for differentiation of the BP-NEN entities was then evaluated, and correlations with the patients' clinical data were calculated (overview over patient population see Figure 1).

## RESULTS

### Ki-67 expression in BP-NEN entities

#### Immunohistochemistry – Ki-67-Average vs. Ki-67-Hotspots vs. digital image analysis

As can be seen from the boxplots of Figure 2 and as confirmed by the Mann-Whitney-Test, Ki-67 protein levels increased highly significantly from TC to AC (Ki-67-Average:  $U = -4.337$ ,  $p < 0.001$ , Ki-67-Hotspots:  $U = -5.041$ ,  $p < 0.001$ ; Ki-67-FADIA:  $U = -2.639$ ,  $p = 0.008$ ) and from AC to SCLC/LCNEC (Ki-67-Average:  $U = -6.592$ ,  $p < 0.001$ ;  $U = -3.913$ ,  $p < 0.001$ , Ki-67-Hotspots:  $U = -6.277$ ,  $p < 0.001$ ;  $U = -3.921$ ,  $p < 0.001$ ; Ki-67-FADIA:  $U = -5.903$ ,  $p < 0.001$ ;  $U = -3.900$ ,  $p < 0.001$ ) in all three evaluation systems. The TC displayed very low data variability, whereas AC and especially SCLC and LCNEC showed a high spread of the proliferation marker protein levels.

It was found, that the evaluation of the Ki-67-Hotspots resulted in higher levels as compared to the use of the Ki-67-Average. A Wilcoxon-Test confirmed that these differences are significant in case of AC, SCLC and LCNEC, but not of TC. The Ki-67-FADIA generally led to lower Ki-67 expression levels compared with the two manual counting evaluation methods. According to the Wilcoxon-Test these differences are highly significant for TC, AC and SCLC (see Table 1). A similar tendency can be seen for LCNEC.

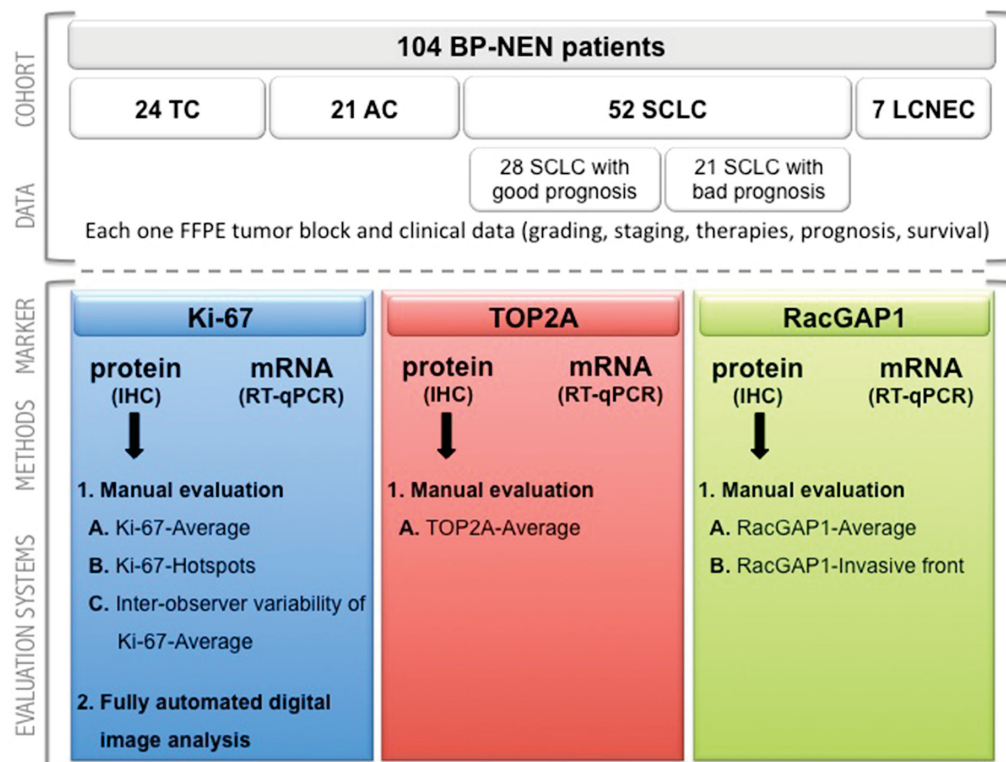
#### Inter-observer comparability

Because the SCLC showed the highest spread of Ki-67 expression levels and the Ki-67-Average evaluation system is subjectively influenced at most, two different observers evaluated a series of 22 randomly selected SCLC samples for the Ki-67-Average in the IHC. In general, observer 1 (L.S.) obtained higher values (median = 72%, arithmetic mean = 65.7%) than observer 2 (E.N.) (median = 56, arithmetic mean = 56, 1%), as can be seen from the boxplots of Figure S1 in the supplemental data. Moreover, observer 1 obtained values with a higher spread and more



**Table 1: Wilcoxon-test for Ki-67-Average vs. Ki-67-Hotspots vs. Ki-67-FADIA evaluation in BP-NEN entities**

Tumor entity	BP-NEN total (n = 102)	TC (n = 24)	AC (n = 21)	SCLC (n = 50)	LCNEC (n = 7)
Ki-67-Hotspot < Ki-67-Average	8	1	0	7	0
Ki-67-Hotspots > Ki-67-Average	69	7	14	41	7
Ki-67-Hotspots = Ki-67-Average	25	16	7	2	0
U-value (Wilcoxon)	-5.662	-1.508	-3.310	-3.973	-2.371
p-value	< 0.001	0.132	0.001	< 0.001	0.018
Ki-67-FADIA < Ki-67-Hotspots	93	18	21	48	6
Ki-67- FADIA > Ki-67- Hotspots	8	5	0	2	1
Ki-67- FADIA = Ki-67- Hotspots	1	1	0	0	0
U-value (Wilcoxon)	-8.183	-3.224	-4.015	-6.115	-2.028
p-value	< 0.001	0.001	< 0.001	< 0.001	0.043
Ki-67-Average < Ki-67- FADIA	12	9	0	2	1
Ki-67- Average > Ki-67- FADIA	89	14	21	48	6
Ki-67- Average = Ki-67- FADIA	1	1	0	0	0
U-value (Wilcoxon)	-8.149	-2.829	-4.015	-6.125	-1.859
p-value	< 0.001	0.005	< 0.001	< 0.001	0.063

**Figure 1: Consort diagram.** Overview of the patient population in terms of the investigated markers in the different evaluation methods. BP-NEN – bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms; TC – typical carcinoids; AC – atypical carcinoids; SCLC – small cell lung cancer; LCNEC – large cell neuroendocrine lung carcinoma; FFPE – formalin-fixed, paraffin-embedded; TOP2A – Topoisomerase 2 alpha; RacGAP1 – Rac GTPase activating protein 1; IHC – immunohistochemistry.

outliers. However, these differences were not statistically significant (Wilcoxon-Test:  $U = -1.721, p = 0.085$ ).

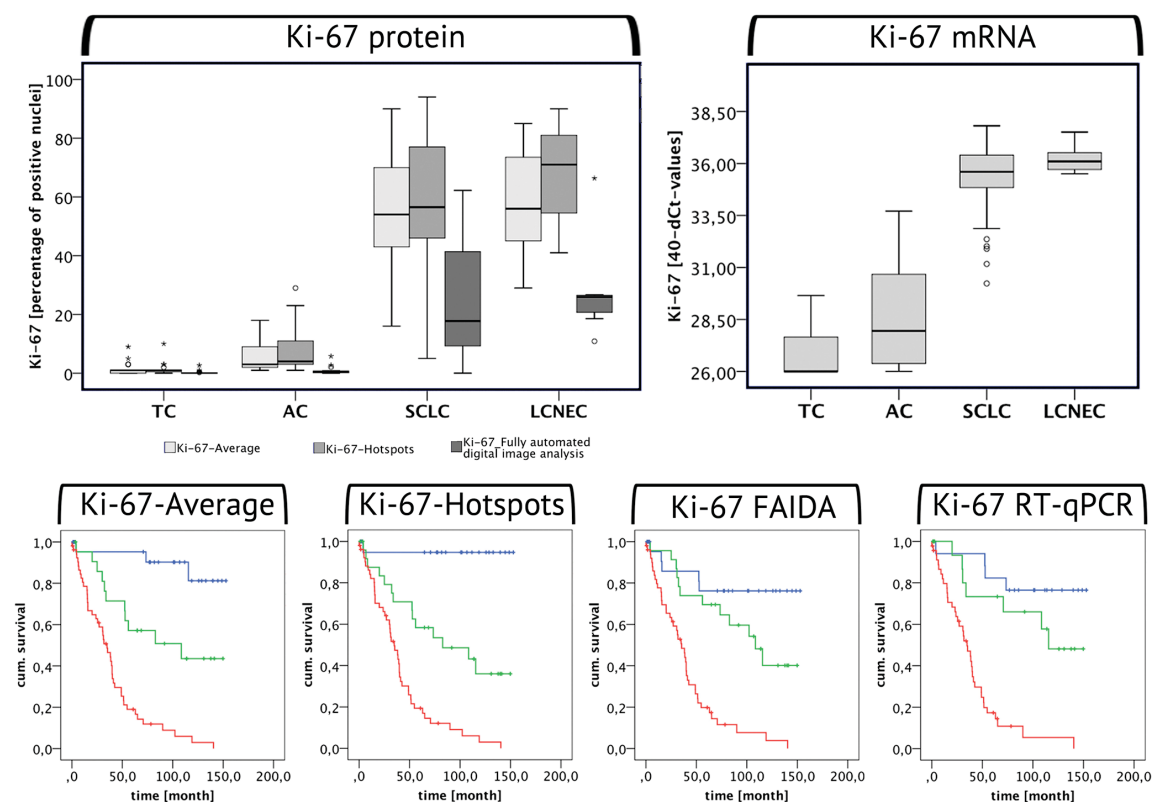
### RT-qPCR

Similar to the IHC, also the Ki-67 mRNA levels were highly significantly increased in AC compared to TC ( $U = -3.199, p = 0.001$ ) and in SCLC/LCNEC compared to AC ( $U = -5.062, p < 0.001/U = -3.446, p < 0.001$ ) (see Figure 2).

### Ki-67 cut-off values for grading

To detect the optimal Ki-67 cut-off points between TC and AC, AC and SCLC and AC and LCNEC, ROC analyses were performed. In our Ki-67-Average evaluation the optimal cut-off value to distinguish TC from AC is 1.5% (AUC = 0.870,  $p < 0.001$ , sensitivity = 0.810, 1-specificity = 0.167), AC from SCLC 19.0% (AUC = 0.998,  $p < 0.001$ , sensitivity = 0.960, 1-specificity =

0.000) and AC from LCNEC 23.5% (AUC = 1.000,  $p < 0.001$ , sensitivity = 1.000, 1-specificity = 0.000). When evaluating the Ki-67-Hotspots the analysed cut-off value between TC and AC amounted to 1.5% (AUC = 0.930,  $p < 0.001$ , sensitivity = 0.952, 1-specificity = 0.167), between AC and SCLC to 22.0% (AUC = 0.974,  $p < 0.001$ , sensitivity = 0.900, 1-specificity = 0.095) and between AC and LCNEC to 35.00% (AUC = 1.000,  $p < 0.001$ , sensitivity = 1.000, 1-specificity = 0.000). In case of the Ki-67-FAIDA the cut-off values were much lower as compared to the manual Ki-67 evaluation methods: TC-AC: 0.14% (AUC = 0.730,  $p = 0.008$ , sensitivity = 0.762, 1-specificity = 0.208), AC-SCLC: 3.23% (AUC = 0.946,  $p < 0.001$ , sensitivity = 0.900, 1-specificity = 0.048), AC-LCNEC: 8.32% (AUC = 1.000,  $p < 0.001$ , sensitivity = 1.000, 1-specificity = 0.000). When analysing the RT-qPCR data, the following limits were obtained: TC-AC: 26.39 (AUC = 0.737,  $p = 0.021$ , sensitivity = 0.733, 1-specificity = 0.278), AC-SCLC: 32.19 (AUC = 0.977,



**Figure 2: Ki-67 expression in BP-NEN.** The boxplots are depicting the Ki-67 protein (left) and mRNA (right) levels in the different BP-NEN entities as evaluated by immunohistochemistry and by RT-qPCR. The different Ki-67-IHC evaluation methods are represented by different shades of grey: The Ki-67-Average is depicted by the first box in light grey, the Ki-67-Hotspots are illustrated in slightly darker grey and the last dark grey box stands for the IHC Ki-67 levels as determined by the fully automated digital image analysis. Beneath the respective Kaplan-Meier-Analyses are shown. Blue indicates low, green moderate and red high Ki-67 expression levels in each evaluation method, according to the cut-off limits of the ROC analysis between TC – AC and AC – SCLC. High Ki-67 expression levels correlate with a poor survival of the patients.

$p < 0.001$ , sensitivity = 0.907, 1-specificity = 0.067), AC-LCNEC: 34.61 (AUC = 1.000,  $p < 0.001$ , sensitivity = 1.000, 1-specificity = 0.000).

### TOP2A expression in BP-NEN entities

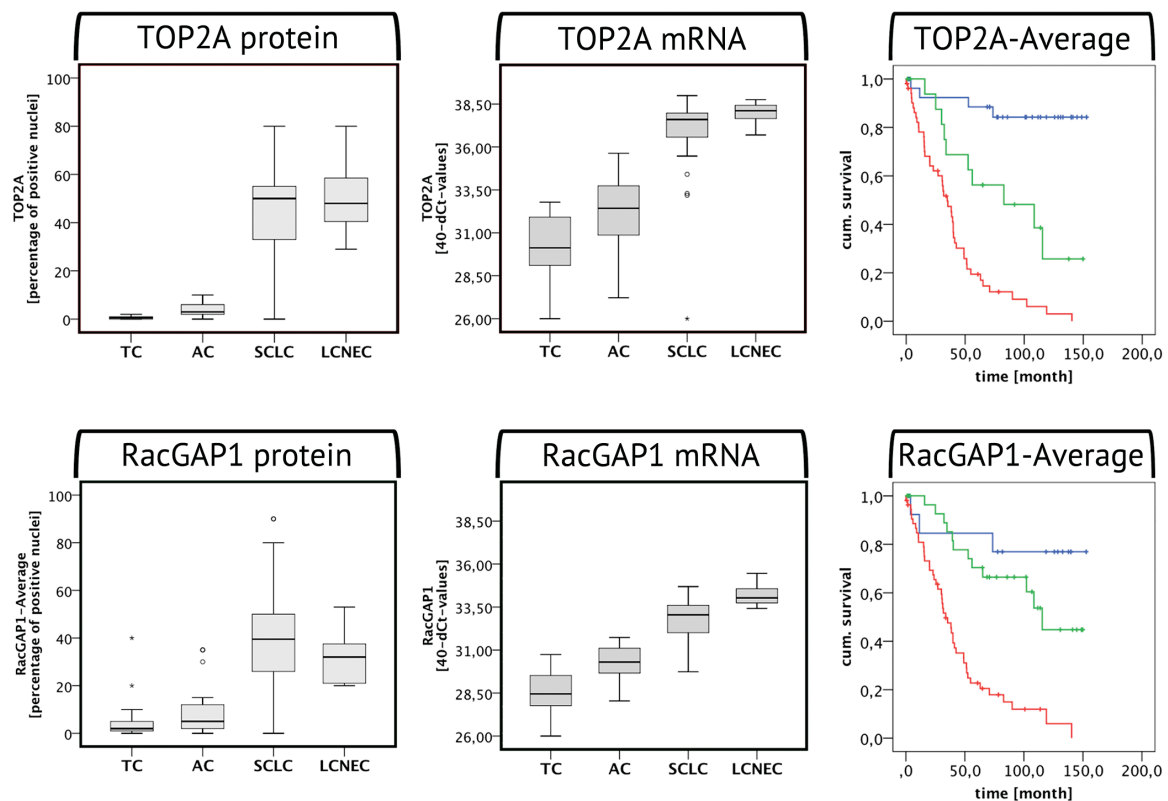
#### Immunohistochemistry

In accordance with the Ki-67 expression levels, the TOP2A-Average protein expression significantly increased from TC to AC (Mann-Whitney-Test:  $U = -4.165$ ,  $p < 0.001$ ) and from AC to SCLC and LCNEC (Mann-Whitney-Test:  $U = -6.376$ ,  $p < 0.001$ / $U = -3.811$ ,  $p < 0.001$ ) (see Figure 3). TOP2A protein expression highly significantly correlated with the Ki-67-Average protein expression ( $\rho_{sp} = 0.896$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 99$ ). According to the ROC analysis, the cut-off values between the respective tumor entities for the TOP2A expression as determined by IHC were as follows: TC-AC: 1.25%

(AUC = 0.896,  $p < 0.001$ , sensitivity = 0.810, 1-specificity = 0.042), AC-SCLC: 15.0% (AUC = 0.981,  $p < 0.001$ , sensitivity = 0.980, 1-specificity = 0.000), AC-LCNEC: 19.5% (AUC = 1.000,  $p < 0.001$ , sensitivity = 1.000, 1-specificity = 0.000).

#### RT-qPCR

The TOP2A mRNA expression showed a highly significant correlation with the Ki-67 mRNA levels (Spearman's rank correlation:  $\rho_{sp} = 0.907$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 83$ ). There were higher TOP2A expression levels in AC compared to TC (Mann-Whitney-Test:  $U = -3.359$ ,  $p = 0.001$ ) and in SCLC/LCNEC compared to AC ( $U = -4.537$ ,  $p < 0.001$ / $U = -3.266$ ,  $p < 0.001$ ) (see Figure 3). In the RT-qPCR the following limits were determined according to the ROC analysis: TC-AC: 31.21 (AUC = 0.780,  $p = 0.006$ , sensitivity = 0.733, 1-specificity = 0.278), AC-SCLC: 34.96 (AUC = 0.955,  $p < 0.001$ ,



**Figure 3: TOP2A and RacGAP1 expression in BP-NEN.** The boxplots are depicting the TOP2A and RacGAP1 protein (left) and mRNA (right) levels in the different BP-NEN entities as evaluated by immunohistochemistry and RT-qPCR. To the right the respective Kaplan-Meier-Analyses of each marker in the IHC investigation are shown. Blue indicates low, green moderate and red high TOP2A/RacGAP1 expression levels, according to the cut-off limits of the ROC analysis between TC – AC and AC – SCLC. With both markers, high expression levels imply poor patient survival.

sensitivity = 0.907, 1-specificity = 0.067), AC-LCNEC: 36.17 (AUC = 1.000,  $p < 0.001$ , sensitivity = 1.000, 1-specificity = 0.000).

### RacGAP1 expression in BP-NEN entities

#### Immunohistochemistry – RacGAP1-Average

The RacGAP1 protein levels also increased from TC to AC (Mann-Whitney-Test:  $U = -2.495$ ,  $p = 0.013$ ) and from AC to SCLC/LCNEC (Mann-Whitney-Test:  $U = -5.705$ ,  $p < 0.001$  /  $U = -3.404$ ,  $p < 0.001$ ) (see Figure 3). RacGAP1 protein expression highly significantly correlated with the Ki-67 ( $\rho_{sp} = 0.733$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 98$ ) and with the TOP2A protein expression ( $\rho_{sp} = 0.739$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 98$ ). The cut-off limits for RacGAP1-Average according to the ROC curve were determined as follows: TC-AC: 1.5% (AUC = 0.705,  $p = 0.019$ , sensitivity = 0.857, 1-specificity = 0.583), AC-SCLC: 13.5% (AUC = 0.897,  $p < 0.001$ , sensitivity = 0.875, 1-specificity = 0.238), AC-LCNEC: 17.5% (AUC = 0.918,  $p = 0.001$ , sensitivity = 1.000, 1-specificity = 0.143).

#### RT-qPCR

In the RT-qPCR, RacGAP1 expression was highly significantly increased in AC as compared to TC (Mann-Whitney-Test:  $U = -4.119$ ,  $p < 0.001$ ) and in SCLC/LCNEC as compared to AC (Mann-Whitney-Test:  $U = -4.116$ ,  $p < 0.001$  /  $U = -3.535$ ,  $p < 0.001$ ) (see Figure 3). In case of RacGAP1 mRNA levels, there was a highly significant increase in LCNEC in comparison to SCLC (Mann-Whitney-Test:  $U = -3.374$ ,  $p < 0.001$ ). RacGAP1 mRNA expression levels showed a highly significant correlation with the respective levels of Ki-67 and TOP2A in a Spearman's rank correlation (RacGAP1 vs. Ki-67:  $\rho_{sp} = 0.894$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 83$ ; RacGAP1 vs. TOP2A:  $\rho_{sp} = 0.898$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 83$ ). In the RT-qPCR the following limits were obtained according to the ROC analysis: TC-AC: 29.62 (AUC = 0.863,  $p < 0.001$ , sensitivity = 0.800, 1-specificity = 0.167), AC-SCLC: 31.52 (AUC = 0.933,  $p < 0.001$ , sensitivity = 0.837, 1-specificity = 0.067), AC-LCNEC: 32.58 (AUC = 1.000,  $p < 0.001$ , sensitivity = 1.000, 1-specificity = 0.000).

### Correlation of Ki-67, TOP2A and RacGAP1 with the mitotic rate

All markers (Ki-67-Hotspots, Ki-67-Average, TOP2A-Average, RacGAP1-Average, Ki-67 mRNA, TOP2A mRNA, RacGAP1 mRNA) displayed a highly significant correlation with the mitotic rate as evaluated by two independent pathologists ( $\rho_{sp} = 0.667$ – $0.889$ ,  $p < 0.001$ – $0.009$ ). According to the Spearman's rank correlation only the Ki-67-FADIA showed no significant association with the mitotic count ( $\rho_{sp} = 0.399$ ,  $p = 0.101$ ).

### Correlation of Ki-67, TOP2A and RacGAP1 with clinical data and extent of necrosis

#### Grading, staging and prognosis

Strong positive correlations with the grading and the T and N stage of the BP-NEN patients investigated could be observed for all three proliferation markers both in IHC and in RT-qPCR (see Table 2). When comparing SCLC patients with good and poor prognosis, solely RacGAP1 protein levels were significantly elevated in patients with poor prognosis.

#### Extent of necrosis

All samples were evaluated for the extent of necrosis as a percentage of the tumor fraction. Here, the expression levels of all three markers in all methods used showed a highly significant correlation to the amount of necrosis, as can be seen from Table 2.

#### Survival

Based on the cut-off limits for TC vs. AC and AC vs. SCLC obtained by means of the ROC analysis, all three proliferation markers were subdivided into low, moderate and high expression levels and Kaplan-Meier-Analyses were performed. All three proliferation markers displayed a strong prognostic value in all methods used (see Figures 2 and 3): high Ki-67, TOP2A and RacGAP1 protein and mRNA levels correlated with poor patient survival. These data were highly significant according to the Log-Rank and Breslow Test.

### Proliferation marker expression in regard to chemotherapy and radiotherapy

Prior to tumor resection or biopsy, 17 patients (1 TC, 4 AC and 12 SCLC patients) had received a chemotherapy and 12 patients (1 TC, 2 AC and 9 SCLC) a radiotherapy. The tumor samples of these patients were compared with the samples from non-treated patients for their respective Ki-67, TOP2A and RacGAP1 mRNA and protein levels as determined by means of the different evaluation methods. According to the Mann-Whitney-Test for all three proliferation markers no marked difference was seen between the two subgroups, regardless of the method of determination. An exception was found in regard to the investigated SCLC patients: Here, the Ki-67-FADIA lead to significantly lower Ki-67 levels in patients with both previous radiotherapy and chemotherapy compared to the untreated SCLC patients (Mann-Whitney-Test: previous chemotherapy vs. untreated group:  $U = -2.680$ ,  $p = 0.007$ ; previous radiotherapy vs. untreated group:  $U = -1.957$ ,  $p = 0.050$ ) (see Figure S2 – supplements). There was neither a difference to be seen between the

**Table 2: Spearman's rank correlations of Ki-67, TOP2A and RacGAP1 protein and mRNA levels with clinical data and extent of necrosis**

	Grading	T stage	N stage	Prognosis	Necrosis
Ki-67-Average (IHC)	$\rho_{sp} = 0.861$ $p < 0.001$ $n = 96$	$\rho_{sp} = 0.498$ $p < 0.001$ $n = 78$	$\rho_{sp} = 0.581$ $p < 0.001$ $n = 79$	$\rho_{sp} = 0.064$ $p = 0.669$ $n = 47$	$\rho_{sp} = 0.595$ $p < 0.001$ $n = 102$
Ki-67 RT-qPCR	$\rho_{sp} = 0.826$ $p < 0.001$ $n = 79$	$\rho_{sp} = 0.508$ $p < 0.001$ $n = 65$	$\rho_{sp} = 0.619$ $p < 0.001$ $n = 66$	$\rho_{sp} = 0.087$ $p = 0.590$ $n = 41$	$\rho_{sp} = 0.483$ $p < 0.001$ $n = 83$
TOP2A-Average (IHC)	$\rho_{sp} = 0.836$ $p < 0.001$ $n = 95$	$\rho_{sp} = 0.446$ $p < 0.001$ $n = 78$	$\rho_{sp} = 0.589$ $p < 0.001$ $n = 79$	$\rho_{sp} = 0.271$ $p = 0.068$ $n = 46$	$\rho_{sp} = 0.599$ $p < 0.001$ $n = 101$
TOP2A RT-qPCR	$\rho_{sp} = 0.809$ $p < 0.001$ $n = 79$	$\rho_{sp} = 0.524$ $p < 0.001$ $n = 65$	$\rho_{sp} = 0.605$ $p < 0.001$ $n = 66$	$\rho_{sp} = 0.175$ $p = 0.273$ $n = 41$	$\rho_{sp} = 0.525$ $p < 0.001$ $n = 83$
RacGAP1-Average (IHC)	$\rho_{sp} = 0.721$ $p < 0.001$ $n = 94$	$\rho_{sp} = 0.364$ $p = 0.001$ $n = 78$	$\rho_{sp} = 0.384$ $p = 0.001$ $n = 79$	$\rho_{sp} = -0.346$ $p = 0.018$ $n = 46$	$\rho_{sp} = 0.479$ $p < 0.001$ $n = 100$
RacGAP1 RT-qPCR	$\rho_{sp} = 0.800$ $p < 0.001$ $n = 79$	$\rho_{sp} = 0.498$ $p < 0.001$ $n = 65$	$\rho_{sp} = 0.519$ $p < 0.001$ $n = 66$	$\rho_{sp} = 0.135$ $p = 0.399$ $n = 41$	$\rho_{sp} = 0.574$ $p < 0.001$ $n = 83$

two groups of patients for the Ki-67-Average nor for the Ki-67-Hotspot evaluation.

### Metastases vs. primary tumors

In the IHC investigations, samples of 87 patients with primary tumors and of 17 patients with metastases were included. Here, regardless of the method of determination, no differences in the protein expression levels of Ki-67, TOP2A or RacGAP1 were found between primary tumors and metastases. With regard to the mRNA levels, which were determined in 72 patients with primary tumors and in 11 patients with metastases, in contrast, the expression levels of Ki-67 were distinctly higher in metastases compared to primary tumors (Mann-Whitney-Test:  $U = -1.969$ ,  $p = 0.049$ ) and there was also a trend towards an increased expression of RacGAP1 (Mann-Whitney-Test:  $U = -1.847$ ,  $p = 0.065$ ) and TOP2A (Mann-Whitney-Test:  $U = -1.793$ ,  $p = 0.073$ ) in metastases (see Figure S3 – supplements).

### Comparison between SCLC with good and with poor prognosis

In a cohort of 49 out of the 52 SCLC patients, comprising subjects with good prognosis ( $n = 28$ , survival  $\geq 30$  months) and with poor prognosis ( $n = 21$ , survival  $< 30$  months) the three markers were investigated for their respective expression levels (see Figure S4 – supplements). Here, RacGAP1 protein levels were significantly higher in patients with poor prognosis compared to those with good prognosis (Mann-Whitney-Test:  $U = -2.323$ ,

$p = 0.020$ ), but there was no difference on the mRNA levels (Mann-Whitney-Test:  $U = -0.855$ ,  $p = 0.392$ ). Ki-67 and TOP2A, in contrast, displayed no differences between the two subgroups of patients both on the protein and on the mRNA level (Mann-Whitney-Test: Ki-67:  $U = -0.434$ ,  $p = 0.664$ / $U = -0.548$ ,  $p = 0.584$ ; TOP2A:  $U = -1.819$ ,  $p = 0.069$ / $U = -1.109$ ,  $p = 0.267$ ).

### RacGAP1 as strong predictor of prognosis – expression at the invasive front

A high RacGAP1 expression at the invasive front of the selected tumor samples with resection margin significantly correlated with a high grading ( $\rho_{sp} = 0.494$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 59$ ), with metastatic disease ( $\rho_{sp} = 0.337$ ,  $p = 0.022$ ,  $n = 46$ ) and with early death by the tumor ( $\rho_{sp} = 0.279$ ,  $p = 0.027$ ,  $n = 63$ ). According to the Kaplan-Meier-Analysis, patients with high RacGAP1 expression levels at the invasive front displayed lower survival as compared to those with low expression levels (see Figure 4).

## DISCUSSION

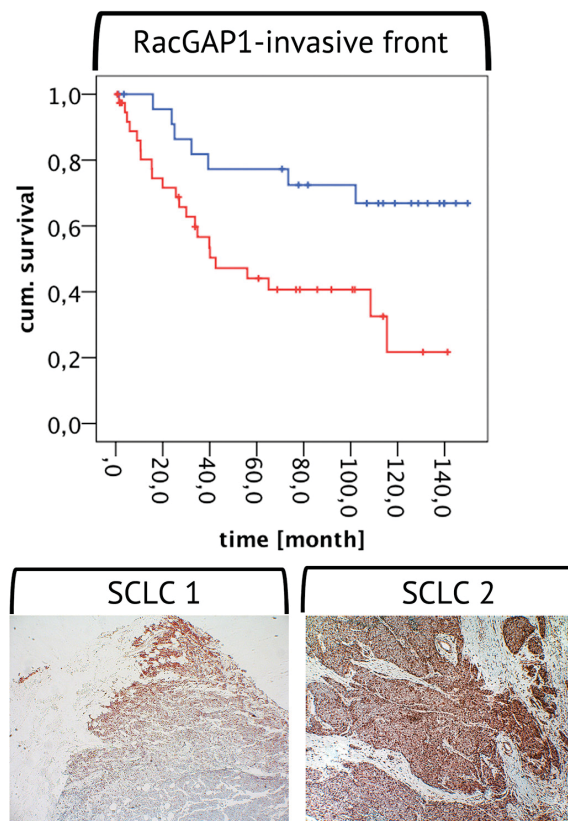
The distinction between the four BP-NEN entities is clinically very important because the subsequent classification-based diagnostic and therapeutic approaches differ due to their differential aggressiveness [3, 5, 6, 29, 30]. Mitosis counting is part of the classification procedure (based on the WHO and IASLC criteria); it is a very time-consuming process, and has a relatively high inter-observer variability [6, 8, 9]. The usefulness and limitations of Ki-67 as a marker for BP-NEN grading and



differentiation are still being discussed. The 2015 WHO classification for pulmonary neuroendocrine tumors only suggests broad ranges for the Ki-67 labeling index in each entity. Therefore, one aim of our study was to reevaluate Ki-67 expression in the tumor samples of a large cohort of BP-NEN patients. The different methods routinely used in clinical practice for the determination of Ki-67 expression levels were compared in this context [5, 12].

The 2014 review by Pelosi et al. describes the many different immunohistochemical evaluation systems used for Ki-67 measurement [8, 9, 12–14, 31, 32]. In the present study, we compared two widely used manual counting methods, the Ki-67-Average (magnification 400×, per 10 representative HPFs) and the Ki-67-Hotspot evaluation (magnification 400×, per 2000 cells), with each other and with a fully automated digital image analysis of Ki-67 IHC. With all three methods, the Ki-67 expression significantly increased from TC to AC similar to previously published results [33]; the greatest increase occurred using Ki-67-Hotspot evaluation and the smallest increase occurred when the Ki-67-FADIA was used. There

were also high and comparable expansions in the Ki-67 expression rates from AC to SCLC/LCNEC for each of the three methods. In the literature it is often described that Ki-67 mainly helps to distinguish low-grade from high-grade BP-NEN [12, 30], but our results also revealed that there was an increase in AC compared with TC. As expected, compared with the Ki-67-Average evaluation, the Ki-67 levels were higher in the Hotspot evaluation in cases of AC, SCLC, and LCNEC, but not TC. AC and, especially, SCLC have broader proliferation intensity ranges, and these more aggressive tumor entities often have one or more highly proliferative areas [8, 34, 35]. The three IHC evaluation methods were highly significantly correlated, but in general, lower proliferation rates were obtained for all tumor entities for Ki-67-FADIA. Here, between the tumor entities, a similar constellation was found as in both manual counting methods. The data are in accordance with many other studies comparing automated digital image analysis with the manual methods, but in some investigations also higher or equal limits were observed [31, 33, 36–38]. The discrepancies between published



**Figure 4: RacGAP1 expression at the invasive front.** Below two examples for a strong positivity of RacGAP1 protein expression at the invasive front are shown (magnification  $10 \times 10$ ). The graph above depicts a Kaplan-Meier-Analysis with a high RacGAP1 protein expression (red line) and a weak/no RacGAP1 expression (blue line) at the invasive front. According to the Log-Rank Test the curves differ highly significantly: High RacGAP1 expression at the invasive front indicates poor patient prognosis.

results may result from differences in the programs used for digital image analysis. Lower values may result from observer bias (i.e., a greater emphasis on positive compared with negative cells), whereas the FADIA allows for an objective evaluation. Furthermore, in our study either 2000 cells or 10 HPFs of a tumor sample were evaluated using the manual counting methods, whereas the FADIA included the whole tumor section. Besides, in the Ki-67-FADIA SCLC patients who underwent prior radiotherapy or chemotherapy had significantly lower Ki-67 index values compared with the untreated SCLC patients. The manual counting methods did not distinguish between these groups. To the best of our knowledge, we are the first group of investigators to perform a digital image analysis of Ki-67 expression in SCLC samples. We performed this sophisticated analysis even though nuclear shape was undefined and crushing artifacts were frequent. Our results appear to be valid, however, because they were consistent with the results using the other Ki-67 evaluation methods.

As often described, the eyeballing methods are subjectively influenced [8, 9, 12, 35]. Therefore, we also included an inter-observer comparison for the Ki-67 Average in 22 randomly selected SCLC patients using two independent observers. For this purpose we chose the SCLC patients because they had the widest range in proliferation rate and the Ki-67 Average evaluation because it displayed the largest relative error. Our study revealed that differences were present, but were not significant. Most authors report that compared with Ki-67 IHC evaluation, inter-observer variability is higher using mitotic counts [8, 9].

All manual counting methods revealed equal cut-off-limits between TC and AC and had good concordance with published results (approximately 2%). Compared with the Ki-67-Hotspot method, the cut-off values that discriminated between AC and SCLC/LCNEC were lower using Ki-67-Average. These limits are frequently discussed and debated in the literature [12, 33], but it is important to recognize that they are methodology-dependent. Our limits using Ki-67-Average were approximately 20% and our limits using Ki-67-Hotspot evaluation were approximately 25%. Nevertheless, our cut-off values were similar to previously established values for GEP-NEN grading [10, 39–43].

RT-qPCR is an emerging objective and reproducible method. Ki-67 mRNA has good clinical value when used for breast cancers, but comprehensive data are needed to determine the clinical value when used for NEN [16]. There were very significant correlations between protein and mRNA levels within adjacent paraffin sections for each of the three markers. We strongly recommend this method to distinguish between BP-NEN entities in routine pathology. However, more studies are needed to further strengthen our suggested limits and to define the correct cut-off values.

The third objective of our study was to investigate other markers that are clinically useful also for discrimination of NEN entities. We chose TOP2A because it is used for breast cancer diagnostics and because, as a target for anthracyclines and topoisomerase II inhibitors, it also has a direct predictive therapeutic value in many cancers [16, 44–47]. Our study revealed that TOP2A was significantly correlated with Ki-67 in our BP-NEN samples. This result occurred for protein and mRNA levels. TOP2A also increased with loss of differentiation, T stage, and grading. Therefore, we propose that TOP2A has clinical value for BP-NEN diagnosis.

RacGAP1 is an as of yet largely unknown but very interesting marker. RacGAP1 also increased from the well- to the poorly-differentiated BP-NEN entities and was strongly correlated with the results for the TOP2A and Ki-67 protein and mRNA levels. These results indicate that RacGAP1 can also be used as a proliferation marker [19]. The Kaplan-Meier-Analysis revealed that similar to the results for Ki-67 and TOP2A, high RacGAP1 levels correlated with poor patient outcome. RacGAP1 expression levels were, in general, lower than those of the other two markers, but a high expression rate was present at the invasive front of some tumor samples. Similarly, a study by Saigusa et al. revealed that the presence of high RacGAP1 levels at the invasive front of gastric cancer is associated with poor patient prognosis [21]. RacGAP1 also has a significantly higher protein expression rate in SCLC patients with a poor prognosis, compared with those with a good prognosis. This difference allows for a prognostic statement with more clarity, compared with the other two markers. The differences between the protein and mRNA levels are likely due to regulation by microRNAs [48, 49]. RacGAP1 is involved in cytokinesis, cell transformation, invasion, migration, and differentiation; it is also involved in tumorigenesis, and tumor progression, metastasis, and recurrence [19, 50–54]. It acts via mechanisms that are very complex and largely unknown. RacGAP1 is overexpressed in many very aggressive cancer phenotypes (e.g., meningiomas, hepatocellular carcinomas, epithelial ovarian cancer, invasive cervical cancer, high-grade breast cancer, colorectal cancer, non-small cell lung cancer, and gastric cancer [16, 18–21, 54–59]), which suggests that it is a new marker with great potential.

All in all, the expression levels of the three markers increase with indicators of tumor aggressiveness, including the T stage, the N stage and the extent of necrosis. A higher proliferation rate increases the risk for a higher extent of tumor growth, lymphatic invasion and the formation of necrosis. Thus, proliferation remains a key role in tumorigenesis and tumor progress.

In conclusion, we propose that Ki-67 should be used as an additional tool for BP-NEN grading and discrimination, with the Ki-67-FADIA as an objective IHC evaluation method. The Ki-67 IHC manual counting methods are also equally useful. They can be performed

quickly and without the need for additional equipment. Here, standardization is needed to establish valid cut-off limits. The cut-off values we obtained for the manual Ki-67 counting method are similar to the limits used for GEP-NEN grading [43].

mRNA quantification using real time RT-PCR appears to be a very valid and objective alternative Ki-67 evaluation method. This approach should be investigated using a larger cohort of BP-NEN patients. Both on protein and on mRNA levels, TOP2A and RacGAP1 can also be used for histopathological differentiation of BP-NEN. RacGAP1 appears to have a strong prognostic value and is an interesting marker that should be examined in detail in future studies.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Formalin-fixed, paraffin-embedded samples (FFPE) of primary tumors or metastases from a total of 104 patients, 24 of which diagnosed with a TC, 21 with an AC, 52 with a SCLC and 7 with a LCNEC, were provided by the Laboratory of Cytology and Pathology, Zentralklinik Bad Berka (Germany). The SCLC patients were further subdivided into patients with a good prognosis ( $n = 28$ , survival  $\geq 30$  months) and those with a poor prognosis ( $n = 21$ , survival  $< 30$  months) (see Figure 1). All tumors were histologically verified by two independent pathologists according to the WHO and UICC criteria. The samples consisted mainly of tumor resections, but also some biopsy samples were included. They comprised mainly primary tumors, but some metastases were evaluated, too. 17 patients had received a previous chemotherapy and 12 patients a previous radiotherapy. A positive vote from the Ethics Committee of the state of Thuringia was gained for this retrospective analysis. Clinical data were collected from the patients records (Zentralklinik Bad Berka, Germany) and from the tumor registry data base (Tumorzentrum Helios-Klinik Erfurt, Germany).

### Immunohistochemistry

From each FFPE (104 samples from 104 BP-NEN patients) 4  $\mu\text{m}$  thick sections were cut and floated onto positively charged slides. The immunohistochemistry was performed by an indirect peroxidase labeling method as described previously [27]. After dewaxing and microwaving of the sections in 10 mM citrate buffer (pH = 6.0) for 16 minutes at 600 W, the slices were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (Ki-67 (mouse monoclonal, 1:50, Dako Germany GmbH, Hamburg, GER), TOP2A (rabbit monoclonal, 1:100, Abcam, Cambridge, UK), RacGAP1 (rabbit polyclonal, 1:350, Atlas Antibodies, Stockholm, SWE)).

The detection was conducted with a biotinylated secondary antibody, followed by the addition of peroxidase-coupled avidin (VECTASTAIN® Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The chromogen used was 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (AEC substrate Pack, BioGenex, Fremont, CA, USA). Finally, cell nuclei were counterstained with Mayer's hematoxylin. Representative immunohistochemical stainings for each marker and tumor entity are shown in Figure 5.

### Manual evaluation methods of the immunohistochemistry

The IHC evaluation was performed by light microscopy. With all three markers, a nuclear staining of tumor cells was defined as a positive expression. Some markers were evaluated by different methods, as follows:

#### Ki-67-Average, TOP2A-Average, RacGAP1-Average

At a magnification of  $10 \times 40$  the total number of cell nuclei and the number of Ki-67, TOP2A or RacGAP1 positive nuclei, respectively, in 10 HPFs were counted manually and then the percentage of positive nuclei was calculated. Here, 10 representative HPFs were selected to determine the average proliferation rate of one tumor sample. In samples smaller than 10 HPFs, all cells were counted. In case of Ki-67, in a series of 22 tumor samples two different observers (E.N. and L.S.) independently evaluated the Ki-67-Average to assess the inter-observer variability.

#### Ki-67-Hotspots

In each sample, the tumor region with the highest density of Ki-67 positive nuclei was selected and, here, the number of Ki-67 positive nuclei in a total of 2000 cells was counted manually at a magnification of  $10 \times 40$ . Finally, the percentage of Ki-67 positive nuclei was calculated.

#### RacGAP1-invasive front

In samples with resection margin ( $n = 66$ ) the front edge between the tumor and the surrounding tissues was defined as the invasive front, where tumor cells migrate into the neighboring tissue. Here, in comparison to the whole tumor and to the surrounding normal tissue, the RacGAP1 expression intensity was evaluated in four gradations: 0 – no RacGAP1 expression, 1 – weak RacGAP1 expression, 2 – moderate RacGAP1 expression, 3 – strong RacGAP1 expression at the invasive front. For further statistical analysis these data were classified into no/weak (0 and 1) and high (2 and 3) RacGAP1 expression at the invasive front.



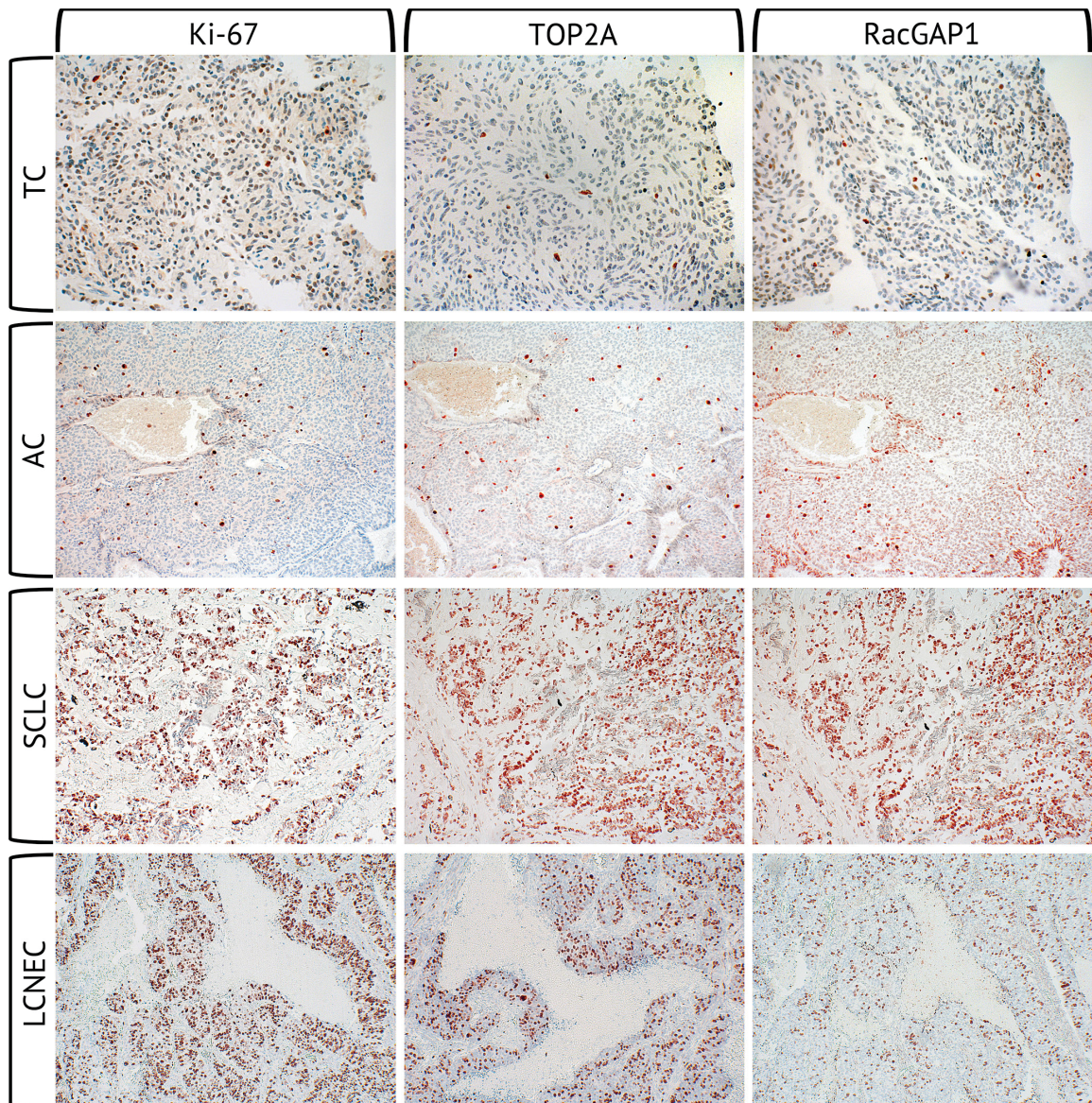
### Fully automated digital image analysis (FADIA) of Ki-67 immunohistochemistry

All Ki-67 stainings were scanned at a magnification of 20× by means of a Hamamatsu digital slide scanner (NanoZoomer 2.0-HT, Hamamatsu Photonics, Japan). In cooperation with Definiens AG, Munich, Germany, the whole tumor areas of the tumor samples were fully automated analyzed by digital image analysis (Definiens Tissue Studio®) for the total number of tumor cell nuclei

and for the Ki-67 positive tumor cell nuclei as previously described [28]. From these data, the percentage of Ki-67 positive nuclei was calculated.

### Real time RT-PCR

The adjacent 4-μm-paraffin sections of the immunohistochemical investigations of randomly selected 17 TC, 19 AC, 41 SCLC (13 with poor prognosis and 24 with good prognosis) and 7 LCNEC were analyzed for



**Figure 5: Immunohistochemical stainings of Ki-67, TOP2A and RacGAP1.** Immunohistochemical staining of Ki-67, TOP2A and RacGAP1 at the same location of each one TC, AC, SCLC and LCNEC sample (magnification 40 × 10).

mRNA expression by a fully automated procedure in cooperation with STRATIFYER Molecular Pathology GmbH, Cologne. The mRNA was measured to draw conclusions on the proliferation marker expression at the transcriptional level. All FFPE were dewaxed and incubated with lysis buffer for 30 minutes. Here, the enzyme Proteinase K, which is contained in the buffer, leads to an enzymatic digestion of cellular components and proteins. After addition of MagiX® RNA buffer, the extracted nucleic acids were bound to paramagnetic beads and the supernatant was pipetted off. Three washing steps followed. Ultimately, an elution buffer was added to release the nucleic acids from the beads. Finally, in the received eluate of nucleic acids the DNA was digested by the enzyme DNase I. All buffers used for the extraction are contained in the Extraction kit-XL (96)® RNA 2.0 (STRATIFYER Molecular Pathology, Cologne, Germany).

Also fully automated, a multiplex TaqMan™-real-time PCR was performed after the extraction step. Here, the SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR kit and the Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were used. All primers and probes were designed by STRATIFYER Molecular Pathology (Cologne, Germany) and manufactured by Eurogentec (Seraing, Belgium). CALM2 (calmodulin 2) served as a housekeeping gene and, in addition, a NTC (No Template Control) and a human reference RNA (QRef, Agilent Technologies, Mark Roeder, Germany) were determined. All samples were measured on a Mx3005P with the software "MxPro version 4.10d". After 40 cycles (50 min 30°C, 2 min 95°C, (15 sec 95°C, 45 sec 60°C) × 40)), a logarithmic analysis at a threshold of 200 was conducted.

### Evaluation of the real time RT-PCR

The values measured were normalized by taking the difference between the Ct-value of the respective marker and the Ct-value of the housekeeping gene (CALM2), subtracted from the maximum number of PCR cycles ( $dCt(norm) = 40 - \Delta Ct (Ct(marker) - Ct(CALM2))$ ). Thus,  $dCt$ -values  $\geq 26.00$  were obtained, which were used for further calculations.  $DCt$ -values  $\geq 26.01$  were classified as positive.

### Statistics

For statistical analysis the program IBM® SPSS® Statistics version 22.0.0 was used. According to the Kolmogorov-Smirnov test, the parameters were not normally distributed. Therefore, as statistical tests the Spearman's rank correlation, the Mann-Whitney-Test, the Wilcoxon-Test and the Kaplan-Meier-Analysis were performed. To evaluate the optimal cut-off values ROC analyses were performed.  $P$ -values  $< 0.05$  were considered statistically significant and  $p$ -values  $< 0.01$  highly significant.

### ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

The THERANOSTICS-Research Center Zentralklinik Bad Berka, Germany, financially supported this study.

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no potential conflicts of interests.

### REFERENCES

1. Travis WD, Rush W, Flieder DB, Falk R, Fleming MV, Gal AA, Koss MN. Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. *Am J Surg Pathol.* 1998; 22:934–944.
2. Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malfertheiner MV, Modlin IM. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer.* 2008; 113:5–21.
3. Hörsch D, Sayeg Y, Bonnet R, Kaemmerer D, Presselt N, Baum RP. [Expert dialogue: neuroendocrine tumours of the lungs and gastroenteropancreatic system]. *Pneumologie.* 2012; 66:44–48.
4. Siddiqui MT. Pulmonary neuroendocrine neoplasms: a review of clinicopathologic and cytologic features. *Diagn Cytopathol.* 2010; 38:607–617.
5. Schnabel PA, Junker K. [Pulmonary neuroendocrine tumors in the new WHO 2015 classification : Start of breaking new grounds?]. *Pathologe.* 2015; 36:283–292.
6. Phan AT, Oberg K, Choi J, Harrison LH, Jr., Hassan MM, Strosberg JR, Krenning EP, Kocha W, Woltering EA, Maples WJ, North American Neuroendocrine Tumor S. NANETS consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: well-differentiated neuroendocrine tumors of the thorax (includes lung and thymus). *Pancreas.* 2010; 39:784–798.
7. Zheng G, Ettinger DS, Maleki Z. Utility of the quantitative Ki-67 proliferation index and CD56 together in the cytologic diagnosis of small cell lung carcinoma and other lung neuroendocrine tumors. *Acta Cytol.* 2013; 57:281–290.
8. Swarts DR, van Suylen RJ, den Bakker MA, van Oosterhout MF, Thunnissen FB, Volante M, Dingemans AM, Scheltinga MR, Bootsma GP, Pouwels HM, van den Borne BE, Ramaekers FC, Speel EJ. Interobserver variability for the WHO classification of pulmonary carcinoids. *Am J Surg Pathol.* 2014; 38:1429–1436.
9. Warth A, Fink L, Fisseler-Eckhoff A, Jonigk D, Keller M, Ott G, Rieker RJ, Sinn P, Soder S, Soltermann A, Willenbrock K, Weichert W, Pulmonary Pathology Working Group of the German Society of P. Interobserver agreement of proliferation index (Ki-67) outperforms mitotic count in pulmonary carcinoids. *Virchows Arch.* 2013; 462:507–513.



10. Miller HC, Drymoussis P, Flora R, Goldin R, Spalding D, Frilling A. Role of Ki-67 Proliferation Index in the Assessment of Patients with Neuroendocrine Neoplasias Regarding the Stage of Disease. *World J Surg.* 2014.
11. Pavel M, Kidd M, Modlin I. Systemic therapeutic options for carcinoid. *Semin Oncol.* 2013; 40:84–99.
12. Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol.* 2014; 9:273–284.
13. Pelosi G, Papotti M, Rindi G, Scarpa A. Unraveling Tumor Grading and Genomic Landscape in Lung Neuroendocrine Tumors. *Endocr Pathol.* 2014.
14. Rindi G, Klersy C, Inzani F, Fellegara G, Ampollini L, Ardizzoni A, Campanini N, Carbognani P, De Pas TM, Galetta D, Granone PL, Righi L, Rusca M, et al. Grading the neuroendocrine tumors of the lung: an evidence-based proposal. *Endocr Relat Cancer.* 2014; 21:1–16.
15. Jarvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Barlund M, Borg A, Grenman S, Isola J. Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol.* 2000; 156:839–847.
16. Milde-Langosch K, Karn T, Muller V, Witzel I, Rody A, Schmidt M, Wirtz RM. Validity of the proliferation markers Ki67, TOP2A, and RacGAP1 in molecular subgroups of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 137:57–67.
17. Hazar-Rethinam M, de Long LM, Gannon OM, Boros S, Vargas AC, Dzienis M, Mukhopadhyay P, Saenz-Ponce N, Dantzie DD, Simpson F, Saunders NA. RacGAP1 Is a Novel Downstream Effector of E2F7-Dependent Resistance to Doxorubicin and Is Prognostic for Overall Survival in Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2015; 14:1939–1950.
18. Imaoka H, Toiyama Y, Saigusa S, Kawamura M, Kawamoto A, Okugawa Y, Hiro J, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M. RacGAP1 expression, increasing tumor malignant potential, as a predictive biomarker for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2015; 36:346–354.
19. Ke HL, Ke RH, Li ST, Li B, Lu HT, Wang XQ. Expression of RACGAP1 in high grade meningiomas: a potential role in cancer progression. *J Neurooncol.* 2013; 113:327–332.
20. Liang Y, Liu M, Wang P, Ding X, Cao Y. Analysis of 20 genes at chromosome band 12q13: RACGAP1 and MCRS1 overexpression in nonsmall-cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013; 52:305–315.
21. Saigusa S, Tanaka K, Mohri Y, Ohi M, Shimura T, Kitajima T, Kondo S, Okugawa Y, Toiyama Y, Inoue Y, Kusunoki M. Clinical significance of RacGAP1 expression at the invasive front of gastric cancer. *Gastric cancer.* 2015; 18:84–92.
22. Li J, Wang J, Jiao H, Liao J, Xu X. Cytokinesis and cancer: Polo loves ROCK'n' Rho(A). *J Genet Genomics.* 2010; 37:159–172.
23. Burkard ME, Maciejowski J, Rodriguez-Bravo V, Repka M, Lowery DM, Clauser KR, Zhang C, Shokat KM, Carr SA, Yaffe MB, Jallepalli PV. Plk1 self-organization and priming phosphorylation of HsCYK-4 at the spindle midzone regulate the onset of division in human cells. *PLoS Biol.* 2009; 7:e1000111.
24. Petronczki M, Glotzer M, Kraut N, Peters JM. Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Dev Cell.* 2007; 12:713–725.
25. Takaki T, Trenz K, Costanzo V, Petronczki M. Polo-like kinase 1 reaches beyond mitosis—cytokinesis, DNA damage response, and development. *Curr Opin Cell Biol.* 2008; 20:650–660.
26. Wolfe BA, Takaki T, Petronczki M, Glotzer M. Polo-like kinase 1 directs assembly of the HsCyk-4 RhoGAP/Ect2 RhoGEF complex to initiate cleavage furrow formation. *PLoS Biol.* 2009; 7:e1000110.
27. Lupp A, Danz M, Muller D. Morphology and cytochrome P450 isoforms expression in precision-cut rat liver slices. *Toxicology.* 2001; 161:53–66.
28. Nowak M, Svensson MA, Carlsson J, Vogel W, Kebschull M, Wernert N, Kristiansen G, Andren O, Braun M, Perner S. Prognostic significance of phospho-histone H3 in prostate carcinoma. *World J Urol.* 2014; 32:703–707.
29. Travis WD. Advances in neuroendocrine lung tumors. *Ann Oncol.* 2010; 217:vii65–71.
30. Sayeg Y, Sayeg M, Baum RP, Kulkarni HR, Presselt N, Mader I, Kunze A, Sanger J, Horsch D, Bonnet R. [Pulmonary neuroendocrine neoplasms]. *Pneumologie.* 2014; 68:456–477.
31. Liu SZ, Staats PN, Goicochea L, Alexiev BA, Shah N, Dixon R, Burke AP. Automated quantification of Ki-67 proliferative index of excised neuroendocrine tumors of the lung. *Diagn Pathol.* 2014; 9:174.
32. van Velthuysen ML, Groen EJ, van der Noort V, van de Pol A, Tesselaar ME, Korse CM. Grading of neuroendocrine neoplasms: mitoses and Ki-67 are both essential. *Neuroendocrinology.* 2014; 100:221–227.
33. Joseph MG, Shibani A, Panjwani N, Arab A, Shepherd J, Stitt LW, Inculet R. Usefulness of Ki-67, Mitoses, and Tumor Size for Predicting Metastasis in Carcinoid Tumors of the Lung: A Study of 48 Cases at a Tertiary Care Centre in Canada. *Lung Cancer Int.* 2015; 2015:545601.
34. Yamamoto S, Chishima T, Mastubara Y, Adachi S, Harada F, Toda Y, Arioka H, Hasegawa N, Kakuta Y, Sakamaki K. Variability in measuring the Ki-67 labeling index in patients with breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2015; 15:e35–39.
35. Singh S, Hallet J, Rowsell C, Law CH. Variability of Ki67 labeling index in multiple neuroendocrine tumors specimens over the course of the disease. *Eur J Surg Oncol.* 2014; 40:1517–1522.
36. van Velthuysen ML, Groen EJ, Sanders J, Prins FA, van der Noort V, Korse CM. Reliability of proliferation assessment

- by Ki-67 expression in neuroendocrine neoplasms: eyeballing or image analysis? *Neuroendocrinology*. 2014; 100:288–292.
37. Fasanella S, Leonardi E, Cantaloni C, Eccher C, Bazzanella I, Aldovini D, Bragantini E, Morelli L, Cuorvo LV, Ferro A, Gasperetti F, Berlanda G, Dalla Palma P, et al. Proliferative activity in human breast cancer: Ki-67 automated evaluation and the influence of different Ki-67 equivalent antibodies. *Diagn Pathol*. 2011; 6:S7.
  38. Tang LH, Gonen M, Hedvat C, Modlin IM, Klimstra DS. Objective quantification of the Ki67 proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36:1761–1770.
  39. Hentic O, Couvelard A, Rebours V, Zappa M, Dokmak S, Hammel P, Maire F, O'Toole D, Levy P, Sauvanet A, Ruszniewski P. Ki-67 index, tumor differentiation, and extent of liver involvement are independent prognostic factors in patients with liver metastases of digestive endocrine carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2011; 18:51–59.
  40. Khan MS, Luong TV, Watkins J, Toumpanakis C, Caplin ME, Meyer T. A comparison of Ki-67 and mitotic count as prognostic markers for metastatic pancreatic and midgut neuroendocrine neoplasms. *Br J Cancer*. 2013; 108:1838–1845.
  41. Scarpa A, Mantovani W, Capelli P, Beghelli S, Boninsegna L, Bettini R, Panzuto F, Pederzoli P, delle Fave G, Falconi M. Pancreatic endocrine tumors: improved TNM staging and histopathological grading permit a clinically efficient prognostic stratification of patients. *Mod Pathol*. 2010; 23:824–833.
  42. Martin-Perez E, Capdevila J, Castellano D, Jimenez-Fonseca P, Salazar R, Beguiristain-Gomez A, Alonso-Orduna V, Martinez Del Prado P, Villabona-Artero C, Diaz-Perez JA, Monleon A, Marazuela M, Pachon V, et al. Prognostic factors and long-term outcome of pancreatic neuroendocrine neoplasms: Ki-67 index shows a greater impact on survival than disease stage. The large experience of the Spanish National Tumor Registry (RGETNE). *Neuroendocrinology*. 2013; 98:156–168.
  43. Richards-Taylor S, Ewings SM, Jaynes E, Tilley C, Ellis SG, Armstrong T, Pearce N, Cave J. The assessment of Ki-67 as a prognostic marker in neuroendocrine tumours: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol*. 2015.
  44. de Resende MF, Vieira S, Chinen LT, Chiappelli F, da Fonseca FP, Guimaraes GC, Soares FA, Neves I, Pagottoy S, Pellionisz PA, Barkhordarian A, Brant X, Rocha RM. Prognostication of prostate cancer based on TOP2A protein and gene assessment: TOP2A in prostate cancer. *J Trans Med*. 2013; 11:36.
  45. Fountzilas G, Christodoulou C, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Xanthakis I, Batistatou A, Pentheroudakis G, Xiros N, Papaspirov I, Koumariou A, Papakostas P, Bafaloukos D, et al. Topoisomerase II alpha gene amplification is a favorable prognostic factor in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *J Transl Med*. 2012; 10:212.
  46. Lukka PB, Chen YY, Finlay GJ, Joseph WR, Richardson E, Paxton JW, Baguley BC. Tumour tissue selectivity in the uptake and retention of SN 28049, a new topoisomerase II-directed anticancer agent. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013; 72:1013–1022.
  47. Parker AS, Eckel-Passow JE, Serie D, Hilton T, Parasramka M, Joseph RW, Wu KJ, Cheville JC, Leibovich BC. Higher expression of topoisomerase II alpha is an independent marker of increased risk of cancer-specific death in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2014; 66:929–935.
  48. Ramalingam D, Happel C, Ziegelbauer JM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs repress breakpoint cluster region protein expression, enhance Rac1 activity, and increase *in vitro* angiogenesis. *J Virol*. 2015; 89:4249–4261.
  49. Greco D, Kivi N, Qian K, Leivonen SK, Auvinen P, Auvinen E. Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS one*. 2011; 6:e21646.
  50. Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev*. 2005; 15:87–96.
  51. Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell*. 2008; 135:510–523.
  52. Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*. 2008; 582:2093–2101.
  53. Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates. *Oncogene*. 2009; 28:1570–1583.
  54. Wang SM, Ooi LL, Hui KM. Upregulation of Rac GTPase-activating protein 1 is significantly associated with the early recurrence of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:6040–6051.
  55. Pliarchopoulou K, Kalogeris KT, Kronenwett R, Wirtz RM, Eleftheraki AG, Batistatou A, Bobos M, Soupos N, Polychronidou G, Gogas H, Samantas E, Christodoulou C, Makatsoris T, et al. Prognostic significance of RACGAP1 mRNA expression in high-risk early breast cancer: a study in primary tumors of breast cancer patients participating in a randomized Hellenic Cooperative Oncology Group trial. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013; 71:245–255.
  56. Yeh CM, Sung WW, Lai HW, Hsieh MJ, Yen HH, Su TC, Chang WH, Chen CY, Ko JL, Chen CJ. Opposing prognostic roles of nuclear and cytoplasmic RACGAP1 expression in colorectal cancer patients. *Hum Pathol*. 2015.
  57. Lu KH, Patterson AP, Wang L, Marquez RT, Atkinson EN, Baggerly KA, Ramoth LR, Rosen DG, Liu J, Hellstrom I, Smith D, Hartmann L, Fishman D, et al. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:3291–3300.

- 
58. Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, Payette T, Pistone M, Stecker K, Zhang BM, Zhou YX, Varnholt H, Smith B, et al. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:5974–5979.
59. Rosty C, Sheffer M, Tsafrir D, Stransky N, Tsafrir I, Peter M, de Cremoux P, de La Rochefordiere A, Salmon R, Dorval T, Thiery JP, Couturier J, Radvanyi F, et al. Identification of a proliferation gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma. *Oncogene*. 2005; 24:7094–7104.

## 6 Diskussion

### 6.1 Patienten und Methodik

#### 6.1.1 Patientencharakteristika

Die Gesamtpopulation der vorliegenden Arbeit zeigte bei den gut differenzierten TC ein Überwiegen des weiblichen Geschlechts und bei den AC eine ausgewogene Geschlechterverteilung, was sich gut mit den Angaben in der Literatur deckt (Modlin et al. 2003, Hörsch et al. 2012, Sayeg et al. 2014, Schnabel und Junker 2015). Obwohl gemäß SEER-Register (Surveillance, Epidemiology and End Results) seit einigen Jahren der Anteil an SCLC-Patientinnen steigt, überwiegt allgemein, und wie auch in der vorliegenden Arbeit, das männliche Geschlecht (Fink et al. 2001, Gustafsson et al. 2008b, Bertino et al. 2009). Auch bei LCNEC wird ein höherer Männeranteil beschrieben (Fink et al. 2001, Beasley 2008, Bertino et al. 2009). Das mediane Erkrankungsalter der untersuchten Patienten zeigte seinen Schwerpunkt in der sechsten Lebensdekade und entspricht somit den Angaben des kleinen deutschen Registers (Berlin Buch), wie sie bei Hörsch et al. (2012) beschrieben wurden. Modlin et al. berichteten dagegen von einem vermehrten Auftreten der BP-NEN in einem Alter von durchschnittlich 59,8 Jahren, was mit den Daten der untersuchten LCNEC übereinstimmt (Modlin et al. 2003).

Obwohl gemäß zahlreichen Literaturangaben (siehe u.a. Gustafsson et al. (2008b), Bertino et al. (2009), Klimstra et al. (2010), Siddiqui (2010), Swarts et al. (2012), Klimstra (2013)) TC eindeutig einem niedrigen G1-, AC einem intermediären G2- und SCLC bzw. LCNEC einem hohen G3-Stadium zugeordnet werden, treten in der Praxis Differenzen auf. So wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt 20 der 26 TC einem G1-Stadium, 4 der TC einem G2-Stadium und sogar 2 einem G3-Stadium zugeordnet. Von den insgesamt 30 AC wurden 7 in ein G1-Stadium, 18 in ein G2-Stadium und 5 in ein G3-Stadium eingestuft. Diese Diskrepanzen beruhen darauf, dass eine Abgrenzung zwischen den Tumorentitäten TC und AC sowie AC und SCLC oft schwierig ist. Die fließenden Übergänge der histologischen Merkmale zwischen zwei Tumorentitäten in Kombination mit dem subjektiven Charakter der Mitosenzählung erschweren eine exakte Einteilung. Bei den untersuchten SCLC und LCNEC, hingegen, wurden alle Präparate einheitlich einem G3-Stadium zugeordnet.

1 TC-, 8 AC-, 27 SCLC- und 3 LCNEC-Patienten des untersuchten Kollektivs wiesen eine Metastasierung auf. Wie für BP-NEN üblich ist, zeigten sich dabei ossäre, zerebrale und adrenale Filiae am häufigsten, gefolgt von Leber-, Lymphknoten- und Lungenmetastasen (Gustafsson et al. 2008b, Siddiqui 2010). Bei TC treten Metastasen selten auf und betreffen eher die regionalen Lymphknoten. In Ausnahmefällen, wie auch in der vorliegenden Arbeit,

metastasieren sie in periphere Organe wie Leber oder Knochen (Fink et al. 2001, Gustafsson et al. 2008b).

Die Populationen von **Manuskript I** und **II** unterscheiden sich geringfügig von denen des **Manuskriptes III**: Bei letzterem war bei einigen TC- und AC-Patienten der Tumoranteil der FFPE bereits aufgebraucht, so dass diese für die Untersuchung des **Manuskriptes III** ausgeschlossen wurden. Bezüglich der SCLC- und LCNEC-Patienten wurde das Kollektiv im **Manuskript III** erweitert.

### 6.1.2 Markerauswahl

Viele Tumore weisen eine verstärkte Expression von Rezeptoren für bestimmte regulative Peptidhormone auf, die sich beim Tumor-Targeting zu Nutze gemacht werden: Sie stellen die molekulare Basis sowohl für die *in-vivo*-Lokalisation der Tumore mittels bildgebender Verfahren, als auch für die gezielte Pharmakotherapie oder Radiorezeptorthherapie mit Hilfe von stabilen Rezeptor-Liganden dar. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Überexpression der SSTR-Subtypen auf neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Über diese kann die Diagnostik und die gezielte radiopharmazeutische bzw. pharmakologische Therapie dieser Tumore mittels (Radionuklid-gekoppelter) Somatostatin-Analoga erfolgen. Mit Hilfe von im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena entwickelten und ausführlich charakterisierten mono- und polyklonalen Kaninchen-Anti-SSTR-Antikörpern sollte in der vorliegenden Arbeit die SSTR-Expression in den bisher noch lückenhaft betrachteten BP-NEN untersucht werden, um die Grundlage für die oben genannten klinischen Interventionen zu geben. Während der Literaturrecherche stellte sich heraus, dass das Grading und die Klassifikation der BP-NEN derzeit noch unter Diskussion stehen und u.a. Ki-67 als potentieller Marker hierfür in Betracht gezogen wird. Da von dieser seltenen Tumorguppe für die vorliegende Arbeit ein großes Kollektiv vorlag, bot sich die Möglichkeit, eine umfassende Übersichtsarbeit zu der entsprechenden Problematik zu erstellen, die praktizierenden Ärzten und Pathologen in der Diagnosestellung weiterhelfen soll. In diesem Zusammenhang wurden weitere Proliferationsmarker untersucht, die von klinischem Interesse sein könnten, wie die TOP2A. Aus der Literaturrecherche ergab sich weiterhin das RacGAP1 als noch weitgehend unbekannter Marker mit sehr großem Potential.

### 6.1.3 Methodenauswahl

Da Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Tumorproben zur Verfügung gestellt wurden, beschränkte sich die Methodenauswahl vorwiegend auf eine Immunhistochemie, Immunfluores-



zenz, *In-situ*-Hybridisierung oder eine auf der Nukleinsäure-Extraktion basierenden PCR (Al-Mulla 2011).

Zur Darstellung der Proteinfraction eines solchen archivierten Materials eignen sich die ersten beiden Methoden, von welchen die Immunhistochemie deutlich mehr Vorteile aufweist: Sie ist ein routinopathologisches Verfahren mit einem guten Kosten- / Nutzen-Verhältnis und einer hohen Reproduzierbarkeit in verschiedenen Laboratorien weltweit. Sie bringt die Möglichkeiten mit sich, das untersuchte Antigen zu lokalisieren und die Proben zeitgleich auf verschiedene Marker zu untersuchen. Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz ist sie dabei durch eine längere Farbstabilität gekennzeichnet und an jedem einfachen Lichtmikroskop auswertbar. Zahlreiche spezifische Antikörper sind hierfür kommerziell erhältlich, auch wenn teilweise unspezifische Färbereaktionen auftreten können und die Auswertung zumeist subjektiv beeinflusst wird (was aber auch für die Immunfluoreszenz gilt).

Um die mRNA-Expression als Vorstufe der Protein-Expression darzustellen, eignen sich sowohl die *In-situ*-Hybridisierung als auch die PCR. Erstere erlaubt, ebenso wie die IHC, eine Lokalisationsanalyse der untersuchten mRNA, die PCR ermöglicht jedoch aus der extrahierten mRNA eines Schnittes eine Vielzahl an Markern in einem sehr kurzen Zeitraum zu analysieren und eine objektive Quantifizierung durchzuführen. Da das molekulare Verfahren der qRT-PCR für die routinopathologische Diagnostik immer interessanter wird, wurde sich in der vorliegenden Arbeit dafür entschieden, die beiden Methoden qRT-PCR und IHC in Kombination durchzuführen. Vergleichend sollten somit die Protein- und mRNA-Expression der untersuchten Marker mit dem geringsten Materialverlust mittels klinisch bedeutsamer Methoden aufgezeigt werden.

## 6.2 SSTR-Expression in BP-NEN

Die Somatostatinrezeptor-Expression ist in BP-NEN bisher nur sehr unzureichend analysiert worden, da entweder nur kleine Patientenkollektive (Reubi et al. 1998, Kimura et al. 1999, Reubi et al. 2000a, Papotti et al. 2001, Lupp et al. 2011, Lupp et al. 2012, Mizutani et al. 2012, Lupp et al. 2013) oder einzelne Subtypen (Reubi et al. 1998, Kimura et al. 1999, Papotti et al. 2000, Papotti et al. 2001, Righi et al. 2010, Lupp et al. 2011, Lupp et al. 2012, Lupp et al. 2013) betrachtet wurden. Ein Schwerpunkt lag dabei auf den Rezeptoren SSTR2A, 3 und 5, wobei der SSTR1 und vor allem der SSTR4 nur sehr selten untersucht worden sind. Die erste umfassende Studie zu BP-NEN mit einer großen Probenanzahl und zu allen SSTR-Subtypen wurde immunhistochemisch durch Tsuta et al. (2012) durchgeführt, die jedoch nur TMAs (Tissue Microarrays) mit 1 µm Durchmesser als Proben verwendeten.

In den Untersuchungen zu **Manuskript I** wurde erstmals eine große Anzahl resezierter BP-NEN auf die Expression aller im humanen Gewebe vorkommenden SSTR mittels zweier Methoden, Immunhistochemie und qRT-PCR, analysiert und die Ergebnisse anschließend miteinander verglichen. Es zeichnet sich als repräsentative Studie mit einer großen Fallzahl, vergleichbaren Gruppengrößen, kompletten Tumorpräparaten, klinischen und *follow-up*-Daten sowie zwei unabhängigen, aber direkt miteinander vergleichbaren Methoden aus. Zwei Monate später wurde eine vergleichbare Studie, allerdings nur in TC und AC, durch Kanakis et al. (2015) online publiziert. Aus dieser wird jedoch nicht ersichtlich, ob die qRT-PCR ebenfalls aus den benachbarten FFPE der IHC oder, wie in den meisten Fällen, aus kryokonservierten Proben anderer Tumorareale durchgeführt wurde. Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die bisherigen Studien zur SSTR-Expression in BP-NEN.

**Tabelle 2: Literaturzusammenfassung der Untersuchungen zur Expression von Somatostatinrezeptoren in bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien.**

Autor	Tumorentität (n)	Detektionsmethode	Subtypen
Reubi et al. (1998)	TC (5)	IHC Autoradiografie (Octreoscan)	SSTR2A
Kimura et al. (1999)	SCLC (2)	IHC	SSTR2A
Papotti et al. (2000)	BP-NEN (26) NSCLC (20)	IHC qRT-PCR	SSTR2A
Reubi et al. (2000)	SCLC (18)	IHC Autoradiografie (Octreoscan)	SSTR2A
Papotti et al. (2001)	TC (11) AC (3) SCLC (1) LCNEC (4) NSCLC (6)	IHC PCR Autoradiografie (Octreoscan)	SSTR2, SSTR3, SSTR5
Righi et al. (2010)	TC (24, metastasiert) AC (73) SCLC (61) LCNEC (60)	IHC	SSTR2A SSTR3
Lupp et al. (2011)	BP-NEN (4)	IHC	SSTR2A, SSTR5
Lupp et al. (2012)	BP-NEN (2)	IHC	SSTR3
Mizutani et al. (2012)	TC (2) AC (1) SCLC (1) LCNEC (4)	IHC qRT-PCR	SSTR1, SSTR2A, SSTR3, SSTR4 (nur qRT-PCR), SSTR5
Tsuta et al. (2012)	TC (59) AC (9) SCLC (56) LCNEC (20)	IHC	SSTR1, SSTR2A, SSTR2B, SSTR3, SSTR4, SSTR5
Lupp et al. (2013)	BP-NEN (3)	IHC	SSTR1
Kanakis et al. (2015)	TC (100) AC (19)	IHC qRT-PCR Autoradiografie	SSTR1, SSTR2A, SSTR3, SSTR4, SSTR5

### 6.2.1 SSTR-Expressionscharakteristika in der immunhistochemischen Färbung

Für die verschiedenen SSTR wurden in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch unterschiedliche Expressionscharakteristika festgestellt, die sich mit den Literaturangaben decken. Der monoklonale Antikörper UMB-7 zeigte für den SSTR1 eine hauptsächlich zytoplasmatische, teilweise aber auch membranständige Immunreaktivität (Mizutani et al. 2012, Tsuta et al. 2012, Lupp et al. 2013). Ebenso verhielten sich auch die Färbungen mit dem monoklonalen UMB-5 gegen den SSTR3 sowie mit dem UMB-4 gegen den SSTR5 (Papotti et al. 2002, Lupp et al. 2011, Lupp et al. 2012, Mizutani et al. 2012, Tsuta et al. 2012, Kanakis et al. 2015). Der SSTR4 zeigte sich hauptsächlich zytoplasmatisch, was auch durch Pelosi et al. (2006) und Tsuta et al. (2012) beschrieben wurde. Beim SSTR2A ergab sich durch den UMB-1 eine eindeutige membranständige Färbung, die in wenigen Fällen zusätzlich schwach zytoplasmatisch war (Kulaksiz et al. 2002, Papotti et al. 2002, Pelosi et al. 2006, Fischer et al. 2008, Kaemmerer et al. 2012, Mizutani et al. 2012, Tsuta et al. 2012). Diese Differenzen zwischen den einzelnen Subtypen könnten auf verschieden hohen Synthese-Raten der SSTR, unterschiedlichen intrazellulären Signaltransduktionskaskaden sowie auf Divergenzen in der Internalisierung der einzelnen Rezeptorsubtypen nach Ligandenbindung basieren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper gegen den SSTR1, 3 und 5 könnten eventuell vor allem internalisierte, phosphorylierte Rezeptoren binden, wohingegen der Anti-SSTR2A-Antikörper bevorzugt membranständige, nicht phosphorylierte Rezeptoren anzielt, obwohl er wie die anderen Anti-SSTR-Antikörper auch gegen den C-Terminus gerichtet ist. Auch ist bekannt, dass dieser Subtyp nach einer Liganden-Bindung und der darauffolgenden Internalisierung zügig wieder in die Zellmembran integriert wird (Kulaksiz et al. 2002).

### 6.2.2 Vergleich der immunhistochemischen Scores zur SSTR-Evaluierung

Da in der Literatur seit vielen Jahren immer noch kein einheitliches System zur immunhistochemischen Auswertung von SSTR besteht, war es Ziel der Untersuchungen zu **Manuskript II**, drei gebräuchliche Scoring-Systeme hinsichtlich Präzision und Auswertungsaufwand miteinander zu vergleichen und die so erhaltenen Daten miteinander zu korrelieren. Diese Analyse erfolgte bereits vor den Untersuchungen zum **Manuskript I** und stellte deren Grundlage dar. Es zeigte sich dabei, dass der IRS, der HER2/neu-Score und auch der H-Score hochsignifikant miteinander korrelieren. Die größten Diskrepanzen stellten sich dabei für den SSTR5 vor allem beim Vergleich der IRS-Klassifikation mit der H-Score-Klassifikation heraus. Die besten  $\tau$ -Werte wurden für die Korrelation der IRS-Klassifikation mit dem HER2/neu-Score erreicht.

In einer Arbeit von Kaemmerer et al. (2012) wurden der IRS als IRS-Klassifikation mit dem HER2/neu-Score an 21 Patienten mit 40 GEP-NEN-Proben bezüglich der Rezeptoren SSTR1 bis SSTR5 miteinander verglichen. Wie in der vorliegenden Arbeit konnten ebenfalls hochsignifikante Korrelationen zwischen beiden Scores für jeden Rezeptor-Subtypen festgestellt werden. Diese beiden Scores wurden, zwar nicht namentlich erwähnt, auch in einer Arbeit von Sciafani et al. (2011) miteinander und mit einer SRS verglichen. Dabei stellte sich für beide IHC-Evaluierungsmethoden eine gute Korrelation zur SRS, mit einer gleichermaßen hohen Spezifität der beiden IHC-Scores, aber einer etwas höheren Sensitivität des auf dem IRS basierenden Scoringsystems heraus. Der IRS, welcher durch Remmele und Stegner ursprünglich für die IHC-Detektion von Estrogen-Rezeptoren in Mammakarzinomen entwickelt worden war, hat auch bei den NEN zunehmend an Bedeutung gewonnen. Seine Vorteile liegen gegenüber dem, für den membranständigen HER2-Rezeptor durch DakoCytomation entwickelten, HER2/neu-Score darin, dass die prozentualen Anteile der verschiedenen Färbungsintensitäten einbezogen werden, was zu einer exakteren Rezeptorexpressionsbestimmung und damit zu einer Relativierung falsch-positiver Ergebnisse führt. Dadurch, dass lediglich der SSTR2A membranständig auftritt, ist die Charakterisierung der anderen SSTR mittels HER2/neu-Score durch dessen genaue Spezifikationen erschwert. Bei Schmid et al. (2012) und Tsuta et al. (2012) erfolgte die Auswertung der SSTR-Expression mit Hilfe des H-Scores (Hormon-Rezeptor-Score). Dieser neuartige Score ist noch genauer als der IRS, indem er die prozentualen Anteile gefärbter Areale nochmals nach der Intensität gewichtet, was letztlich zu einem Ergebnis von 0 bis 300 Punkten führt. Zwar kann mit diesem Instrument eine genauere Charakterisierung der Rezeptorexpressionsstärke als mit den älteren Scores erzielt werden, doch steigt hier die relative Fehlerquote, da die subjektiv-geprägte immunhistochemische Auswertung eine so genaue Einschätzung von Prozentzahlen nicht gewährleistet. Die Präparate sind meist so groß (Ausnahme Biopsien und Probeexzisionen), dass sie nicht mit einem Blick in ganzer Fülle mikroskopisch betrachtet werden können und zudem die heterogene SSTR-Expression das genaue Abwägen der Prozentzahlen pro Färbintensität erschwert. Aufgrund der besseren Praktikabilität und der hinreichend genauen Bewertung von Färbintensität und Prozentanteil der gefärbten Areale erscheint der IRS den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nach als am meisten adäquat. Nicht zuletzt wurden auch bei Kaemmerer et al. (2012) mit Hilfe des IRS, nicht aber des HER2/neu-Scores, signifikant positive Korrelationen zwischen der SSTR2A-Immunhistochemie und der  $SUV_{max}$  (maximaler Standardized Uptake Value) des entsprechenden  $^{68}\text{Ga}$ -DOTANOC-PET/CTs festgestellt. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden für den IRS die besten Korrelationen mit der qRT-PCR erreicht. Aus diesem Grund wurde im **Manuskript I** ausschließlich der IRS als IHC-Evaluierungsmethode verwendet.

### 6.2.3 SSTR-Expressionshäufigkeiten und -intensitäten

Die vorliegende Untersuchung ergab, dass der SSTR1 sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene einer der am häufigsten exprimierten Rezeptorsubtypen in den analysierten BP-NEN war. In TC und AC stellte er sich sogar als der in den meisten Fällen exprimierte SSTR heraus, wohingegen seine Expressionsrate in SCLC deutlich geringer war und er in der qRT-PCR sogar nur noch in einem SCLC detektiert werden konnte. Trotz geringer Studienlage stimmen diese Ergebnisse sehr gut mit den Daten von Kanakis et al. (2015) und Tsuta et al. (2012) überein, bei welchen TC und AC ebenfalls sehr hohe SSTR1-Expressionslevel zeigten. Auch aus der immunhistochemischen Analyse von Tsuta et al. (2012) wird ersichtlich, dass der SSTR1 in SCLC wesentlich geringer exprimiert wird als in den besser differenzierten Tumorentitäten (79,7% bzw. 77,8% Positivität in TC bzw. AC versus 27,6% Positivität in SCLC).

Der SSTR2A stellt den in der Literatur am häufigsten untersuchten Rezeptorsubtypen in BP-NEN dar. Obwohl dabei vorwiegend beschrieben wird, dass er der meist exprimierte SSTR-Subtyp in BP-NEN sei, konnte diese Aussage im **Manuskript I** nicht bestätigt werden (Papotti et al. 2001, Pelosi et al. 2006, Volante et al. 2008, Mizutani et al. 2012, Tsuta et al. 2012, Zarogoulidis et al. 2012). Beide in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden ergaben verblindet sehr hohe Korrelationen mit einer Positivität von etwa 45%, wie ebenfalls durch Righi et al. (2010) gezeigt werden konnte. Auch in der allgemeinen NEN-Literatur wird beschrieben, dass BP-NEN als Foregut-Tumore deutlich seltener SSTR exprimieren als Mitteldarm- und Hinterdarm-Tumore. In GEP-NEN wird beispielsweise von einer durchschnittlichen SSTR2A-Expression in 80% der Fälle gesprochen (Kaemmerer et al. 2012), so dass sich daraus für BP-NEN andere therapeutische und diagnostische Konsequenzen in Bezug auf die SSA-Auswahl ergeben. Zwischen den einzelnen Entitäten konnten im Übrigen keine signifikanten Unterschiede für die SSTR2A-Expression festgestellt werden, so dass, ähnlich wie bei Tsuta et al. (2012), TC, AC und SCLC in etwa gleiche Expressionslevel aufweisen.

Wie auch in anderen Publikationen beschrieben, scheint der SSTR3 in BP-NEN nur selten und dann nur schwach exprimiert zu werden (van Hoek et al. 2009, Mizutani et al. 2012).

Die Spezifität aller verwendeten Antikörper wurde durch Peptidneutralisationen bestätigt, so dass falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden können. Lediglich der polyklonale Antikörper gegen den SSTR4 zeigte trotz Neutralisation noch schwache zytoplasmatische Hintergrundfärbungen, welche in die Auswertung nicht einbezogen, und nur Areale mit einer scheinbar positiven Immunreaktivität bewertet wurden. Aufgrund des Fehlens eines spezifischen Antikörpers wurde in vielen Studien der SSTR4 nicht betrachtet (Papotti et al. 2001, Righi et al. 2010, Mizutani et al. 2012). Auch andere, für die vorliegenden Untersuchungen zuvor getestete, kommerziell erhältliche anti-hSSTR4-Antikörper führten zu ernüchternden, teilweise sogar schlechteren Ergebnissen. Schließlich stellte sich eine geringe Positivitätsrate

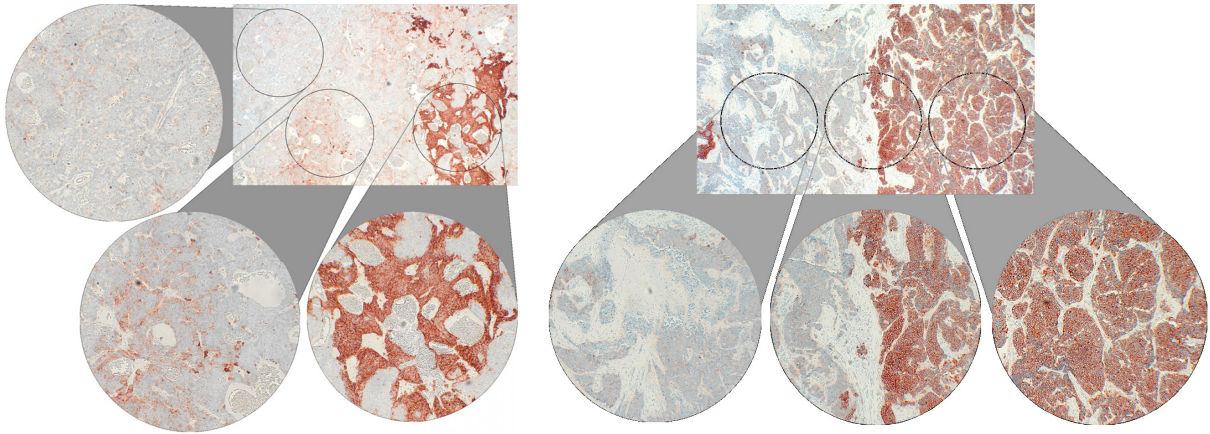


mit schwacher Expressionsintensität sowohl in der IHC als auch in der qRT-PCR heraus. Auch Tsuta et al. (2012) konnten den SSTR4 nur selten detektieren und bei Kanakis et al. (2015) blieben alle Präparate negativ. Dieser Rezeptorsubtyp scheint also (wie auch der SSTR3) eine untergeordnete Rolle in BP-NEN zu spielen.

Ein in dieser Arbeit sehr häufig nachgewiesener Rezeptor ist der SSTR5. Die SSTR5-Expression nahm sowohl in der Immunhistochemie als auch in der qRT-PCR-Analyse in der vorliegenden Arbeit zu den schlecht differenzierten Tumorentitäten der BP-NEN hin leicht ab, obwohl sowohl durch Pelosi et al. (2006), als auch durch Mizutani et al. (2012) beschrieben wird, dass der SSTR5 eher in SCLC als in non-SCLC auftritt. Auffällig war jedoch eine hochsignifikante Koexpression des SSTR5 mit dem SSTR1 in beiden verwendeten Methoden. Rocheville et al. (2000) berichteten von einer Heterodimerisierung dieser beider Rezeptorsubtypen. Dabei bleibt offen, ob dieses Bild auch in BP-NEN auftritt und eventuell zu einem veränderten pharmakologisch-funktionellen Profil mit möglicherweise anderen Signaltransduktionskaskaden oder einer modifizierten Empfindlichkeit gegenüber der Stimulation mit einem Agonisten führt (Pelosi et al. 2006).

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit mittels beider Methoden vorwiegend die Subtypen SSTR1, 2A und 5 in den untersuchten BP-NEN detektiert. Diese Häufigkeitsverteilung ist mit den Arbeiten von Zatelli et al. (2005) und Kanakis et al. (2015) übereinstimmend. Auch bei Tsuta et al. (2012) zeigten sich der SSTR1 und der SSTR2A am häufigsten exprimiert. In deren Studie war jedoch der SSTR5 kaum positiv, was die Arbeitsgruppe damit begründete, dass sie als Proben TMAs verwendeten, welche durch die heterogene SSTR-Expression zu Fehlbeurteilungen führen können (Tsuta et al. 2012). Beispiele für heterogene SSTR-Expressionsmuster von Präparaten der vorliegenden Arbeit und die daraus resultierenden Folgen für die Bewertung, nach Ausstanzungen einer TMA-Probe aus jeweils unterschiedlichen Regionen des Präparates, sind in der Abbildung 18 dargestellt.

Ein weiterer Grund, dass bei Tsuta et al. (2012) und bei Kanakis et al. (2015) eine höhere Expression des SSTR2A und auch geringfügig des SSTR3 gefunden wurde, als in der vorliegenden Untersuchung, kann darin begründet sein, dass beide Studien die entsprechenden polyklonalen Antikörper von Gramsch Laboratories verwendeten: diese zeigten in laboreigenen Vergleichen mit den monoklonalen UMBs, die in der vorliegenden Studie verwendet wurden, gehäuft unspezifische Nebenfärbungen.



**Abbildung 18: Heterogenität der SSTR-Expression.** Zwei Beispielpreparate, gefärbt für den SSTR2A (Vergrößerung 100x), bei welchen drei jeweils aus unterschiedlichen Regionen des Präparates entnommene TMA-Stanzproben mit 1 µm Durchmesser zu drei unterschiedlichen Bewertungen des gleichen Präparates führen würden.

#### 6.2.4 Intraindividuelle Standardabweichung der SSTR-Expression in der Immunhistochemie

Während der IHC-Auswertung war auffällig, dass alle SSTR-Färbungen sehr heterogen ausgeprägt waren. Vereinzelte Zellen oder Zellcluster zeigten sich stärker gefärbt als andere. Diese Expressionsunterschiede konnten nicht nur innerhalb eines Tumors, sondern auch zwischen den verschiedenen Tumoren eines Patienten sowie zwischen den einzelnen Patienten beobachtet werden, was u.a. auch schon durch Sclafani et al. (2011) und Tsuta et al. (2012) beschrieben worden war.

Da zu einigen Patienten verschiedene Tumorblöcke vorlagen, wurde die intraindividuelle Standardabweichung der immunhistochemischen SSTR-Expression ermittelt, um die Schwankungsbreite der Rezeptorexpression innerhalb eines Tumors oder verschiedener Tumorknoten aufzuzeigen. Dabei stellte sich in allen verwendeten Scores der SSTR2A als der Subtyp mit den größten Expressionsschwankungen innerhalb eines Tumors bzw. Patienten heraus. Große Standardabweichungen ergaben sich auch für den SSTR5 im IRS sowie für den SSTR1 und den SSTR5 im H-Score.

Bisher wurden in keiner vorherigen Publikation intraindividuelle oder auch intratumorale Standardabweichungen ermittelt. Nichtsdestotrotz ist allgemein bekannt bzw. wurde in einigen Studien erwähnt, dass die SSTR-Expression sowohl zwischen den Patienten, als auch zwischen den Tumoren eines Patienten sowie im gleichen Tumor stark variieren kann (u.a. Kulaksiz et al. (2002), Pelosi et al. (2006), Volante et al. (2008), Mizutani et al. (2012)).

### **6.2.5 Korrelationen der SSTR-Expression mit klinischen und histopathologischen Patientendaten**

Wie bereits beschrieben, wird das Grading und die Differenzierung der BP-NEN in die verschiedenen Entitäten anhand der Anzahl der Mitosen in 10 HPF bei 400-facher Vergrößerung in Kombination mit der Anwesenheit von Nekrosen bestimmt (Phan et al. 2010, Schnabel und Junker 2015). Da die Übergänge zwischen den Entitäten fließend sind und häufig auch verschiedene Typen in Kombination auftreten, ist eine exakte Unterscheidung, v.a. zwischen AC und SCLC, sehr schwierig, aber maßgeblich für die darauffolgende Therapie. In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass der SSTR1 auf Proteinebene, aber vor allem auf mRNA-Ebene, in SCLC deutlich seltener bis gar nicht exprimiert wird, sodass sich dieser Rezeptor-Subtyp als zusätzlicher Marker zur Abgrenzung beider Entitäten eignen könnte. Weder der Zusammenhang mit einer verbesserten Überlebensrate der Patienten bei hoher SSTR1-Expression noch die negative Korrelation mit dem Grading konnten bisher gezeigt werden und eröffnen daher neue prognostische, diagnostische und therapeutische Möglichkeiten. Auch wenn es in der Arbeit von Tsuta et al. (2012) ebenfalls Hinweise darauf gibt, sollte die Validität dieser Beobachtung in weiterführenden Studien jedoch überprüft werden.

Der SSTR5 ergab in der vorliegenden Arbeit eine Expressionsabnahme zu den schlecht differenzierten Tumorentitäten der BP-NEN hin und somit eine negative Korrelation mit dem Grading, was weder durch Mizutani et al. (2012) noch durch Schmid et al. (2012) beschrieben wurde. In beiden Untersuchungen wurde der SSTR5 eher mit einer schlechten Differenzierung und der Anwesenheit von Metastasen und Angioinvasion assoziiert. Wie auch die vorliegende Arbeit bestätigt, postulieren neuere Studien jedoch, dass der SSTR5 in den benigneren Entitäten anderer Tumore höher exprimiert wird und eine prognostisch günstigere Aussage impliziert (Silva et al. 2015).

### **6.2.6 SSTR-Expression im Vergleich zwischen Immunhistochemie und qRT-PCR**

In einer Spearman-Rangkorrelation konnte gezeigt werden, dass die qRT-PCR mit allen verwendeten IHC-Scoring-Systemen bezüglich der Subtypen SSTR1 und SSTR2A hochsignifikant korrelierte. Des Weiteren konnten signifikante Korrelationen mit den qRT-PCR-Daten des SSTR5 und der IRS-Klassifikation der immunhistochemischen SSTR5-Bestimmung festgestellt werden. Wie bei den von Mizutani et al. (2012) untersuchten 32 NEN, war der SSTR3 auch in der vorliegenden Arbeit durch die qRT-PCR-Analyse nicht nachweisbar.

Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Untersuchung von Kanakis et al. (2015) ermittelt, bei welchen ebenfalls der SSTR1, der SSTR2A und der SSTR5 auf mRNA-Ebene am häufigsten

detektiert und v.a. für den SSTR1 und den SSTR2A hohe Konkordanzen zwischen IHC und qRT-PCR festgestellt wurden. Weiterhin korrelierten diverse Arbeiten von Papotti et al. qualitative immunhistochemische und RT-PCR-Daten miteinander und stellten in allen hohe Konkordanzen (~ 90%) zwischen beiden Methoden bezüglich der SSTR-Expression fest (Papotti et al. 2000, Papotti et al. 2001, Papotti et al. 2002). In einer anderen Untersuchung durch Schmid et al. (2012) wurden drei Pankreas-NET und fünf GH-produzierende Hypophysenadenome mittels qRT-PCR und immunhistochemisch durch monoklonale Antikörper der Novartis Pharma GmbH auf die Expression der SSTR1-5 analysiert. Dabei konnten ebenfalls signifikante Korrelationen für die SSTR1, 2A, 3 und 5 festgestellt werden. Alle 6 Proben, die niedrige IHC-Level für den SSTR4 aufwiesen, zeigten auch niedrige mRNA-Level.

Zwischen den Methoden auftretende diskrepante Fälle können verschiedene Ursachen haben: Im Falle von PCR-negativen, aber IHC-positiven Präparaten können sich unterschiedliche Ausgangsmaterialien (gefrorene Probe in der PCR und Paraffin-eingebettete Blöcke in der IHC) eines Tumors mit heterogener SSTR-Expression ausgewirkt haben. Das Auftreten PCR-positiver, aber IHC-negativer Präparate, könnte auf einer verminderten Antigenbindung nach Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung sowie der geringeren Rezeptor-Expression auf Proteinebene basieren. Auch uneinheitliche immunhistochemische Auswertungssysteme mit unterschiedlichen Grenzwerten für die Positivität können die Vergleichbarkeit zwischen der IHC und der qRT-PCR beeinflussen. Trotz der guten Korrelationen beider Methoden in den verhältnismäßig wenigen, bisher durchgeführten Untersuchungen sind die Rezeptorproteine per se das endgültige Target natürlicher und synthetischer Liganden, auch wenn zwei Methoden in Kombination besser sind, um zuverlässig die Anwesenheit und die zelluläre Lokalisation spezifischer SSTR-Subtypen zu definieren. In vorhergehenden Studien durch Janson et al. (1998), Papotti et al. (2000), Papotti et al. (2001), Papotti et al. (2002) und Kanakis et al. (2015) wurde bereits belegt, dass immunhistochemische Befunde sehr gut mit molekularen und *in-vivo*-Daten korrelieren, was in der vorliegenden Arbeit nochmals bestätigt werden konnte.

### **6.2.7 Bedeutung der SSTR in Diagnose und Therapie von BP-NEN**

In der routinepathologischen Diagnostik werden SSTR immunhistochemisch additiv an Biopтатаen oder Resektaten untersucht, um aufgrund einer auffälligen Morphologie zu bestätigen, dass ein Tumor neuroendokriner Genese ist und weitere SSTR-basierte Diagnostiken oder Therapien Verwendung finden können. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es sinnvoll ist, diese Untersuchungen auch auf BP-NEN auszuweiten, da auch hier SSTR in ausreichender Menge exprimiert werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Immunhistochemie sowie die qRT-PCR methodisch gleichermaßen für die Ermittlung der SSTR-Expression geeignet sind.

Darüber hinaus stellte sich der SSTR1 in beiden Methoden als ein zusätzlich unterstützender Cut-off-Marker in der Abgrenzung zwischen AC und SCLC heraus.

Auch SSTR-basierte *in-vivo*-Diagnostik- und -Therapie-Verfahren haben in GEP-NEN bereits einen großen Stellenwert, da bekannt ist, dass diese Tumorgruppe vor allem den SSTR2A (> 80% der Fälle), aber auch sehr häufig den SSTR1 und SSTR5 exprimiert (Papotti et al. 2002, Volante et al. 2007, Diakatou et al. 2011). Daher kann mit den herkömmlichen SSA, welche v.a. den SSTR2A binden, eine bildgebende Diagnostik (OctreoScan oder <sup>68</sup>Ga-DOTATOC- /-DOTATATE-PET/CT) erfolgen oder, wie sich auch in der Praxis bewährt hat, eine langfristige Therapie mit long-acting SSA (Sandostatin® LAR®, Somatuline Autogel®, Somatuline PR®) zur Symptomkontrolle eines paraneoplastischen Syndroms durchgeführt werden (Gabriel et al. 2007, Baum und Kulkarni 2012, Pavel et al. 2013). Eine weitere sehr vielversprechende Therapiemöglichkeit, vor allem in fortgeschrittenen Krankheitsstadien, stellt die PRRT dar (Baum und Kulkarni 2012, Bergsland 2013). Ihr Nutzen konnte erstmals in einer prospektiven, randomisierten Studie (NETTER-1) an Ileum-NEN bestätigt werden (Halperin et al. 2016).

Für BP-NEN-Patienten waren diese *in-vivo*-Diagnose- und Therapiemöglichkeiten bisher nicht gegeben, da eine umfassende wissenschaftliche Grundlage hierzu fehlte. Auch große klinische Studien wie CLARINET oder PROMID, sowie RADIANT-4 betrachten BP-NEN, wenn überhaupt, nur als Randgruppentumore. Aus einigen Einzelfallberichten wird jedoch ersichtlich, dass die derzeitigen Diagnosemöglichkeiten (CT, Bronchoskopie) inadäquat sind (Kaemmerer et al. 2011, Hörsch et al. 2012). Pelosi et al. berichteten im Jahre 2006 zum ersten Mal davon, SSA in der Diagnose und Therapie von BP-NEN einzusetzen. In die NANETS-Guideline zur klinischen Handhabung gut-differenzierter thorakaler NEN (2010) wurde trotz schlechter Studienlage sogar aufgenommen, dass eine SRS bei diesen Tumoren Verwendung finden kann, für die PET/CT eine unzureichende Studienlage vorliegt und es die Möglichkeit gibt, SSA bei Patienten mit paraneoplastischen Syndromen einzusetzen (Phan et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte die Empfehlung dahingehend erweitert werden, dass auch die schlecht-differenzierten BP-NEN den SSTR2A in 50% der Fälle exprimieren und von einer SSTR-basierten Therapie und Diagnostik mit herkömmlichen SSA profitieren könnten. Da aber der SSTR2A deutlich seltener exprimiert wird als in GEP-NEN, ist hier in der Diagnostik eine vorherige SSTR-Subtypen-Stratifizierung dringend notwendig. Aufgrund der hohen Expressionsraten des SSTR1 in TC und AC und der in der vorliegenden Untersuchung beobachteten Tatsache, dass in den Tumoren in der Regel mindestens ein SSTR ausgeprägt auftritt, erscheint der Einsatz von Pan-Somatostatin-Analoga gegenüber den nur auf den SSTR2A-abzielenden Substanzen in BP-NEN überlegen. So bindet Pasireotid im Gegensatz zu den herkömmlichen SSA nicht nur vorwiegend an den SSTR2A, sondern mit sehr hohen Affinitäten auch an den SSTR1, den SSTR3 und mit sogar subnanomolarer Affinität an den SSTR5. Somit kann ein wesentlich breiteres Spektrum an SSTR erreicht werden. Die ersten



klinischen Studien hierzu haben bereits begonnen (1. LUNA: Pasireotid LAR allein oder in Kombination mit Everolimus in Lungen- und Thymus-NEN; 2. Pasireotid LAR und Topotecan in Patienten mit schwerer SCLC-Erkrankung). Somit stellen SSTR in BP-NEN ein Paradebeispiel für Zielstrukturen dar, die eine stratifizierte Diagnostik und anschließende Therapie ermöglichen. In Abhängigkeit vom jeweiligen SSTR-Expressionsmuster sollte das entsprechende SSA gewählt werden, wobei berücksichtigt werden sollte, dass herkömmliche SSA weniger Nebenwirkungen aufweisen als Pasireotid.

### **6.3 Expression der Proliferationsmarker Ki-67, TOP2A und RacGAP1 in BP-NEN**

Eine erhöhte Proliferationsaktivität ist ein Hauptmerkmal von Neoplasien und deren Ausmaß gibt Aufschluss über das Wachstumsverhalten und die Aggressivität eines Tumors. Sie kann anhand zahlreicher Parameter detektiert werden, deren Ausprägung schließlich für die Therapieplanung entscheidend ist. Ein wesentlicher Marker ist dabei das Ki-67-Antigen, welches die gesamte aktiv proliferierende Fraktion eines Tumors aufzeigt. Es dient somit als Surrogatparameter für das biologische Verhalten der Neoplasien und wird in die klinischen Werte des Differenzierungsgrades und des Gradings übersetzt, woraus sich wiederum die Prognose sowie das diagnostische und therapeutische Vorgehen ableiten lassen. In der pathologischen Diagnostik hat seine immunhistochemische Bestimmung bereits einen hohen Stellenwert bei vielen verschiedenen Malignitäten (Deng et al. 2015). Für das Grading gastroenteropankreatischer NEN wurde es 2006 erstmals durch die ENETS in Betracht gezogen und schließlich 2010 in die WHO-Klassifikation zur Unterscheidung von GEP-NEN in NET G1 (Ki-67 < 3%), NET G2 (Ki-67 3-20%) und NEC G3 (Ki-67 > 20%) integriert (Singh et al. 2014, van Velthuysen et al. 2014b). In Diskussion ist immer wieder eine Anhebung der Grenze der G1-NEN auf 5%, um klinisch eine bessere Differenzierung zu den G2-NEN darzustellen (Pape et al. 2008, Hentic et al. 2011, Martin-Perez et al. 2013, Bertani et al. 2014). Neuere Untersuchungen plädieren hingegen wieder für die Beibehaltung der ursprünglichen, gemäß WHO-Definition noch aktuellen Cut-off-Werte (Richards-Taylor et al. 2015).

Ob die Ki-67-Expression auch für das Grading von BP-NEN herangezogen werden kann, wird ebenfalls seit geraumer Zeit mit verschiedenen Auffassungen diskutiert. Es existieren hierzu einige Studien, die jedoch vorwiegend nur die Tumorentitäten TC und AC betrachteten, unterschiedliche Ki-67-Auswertungsmöglichkeiten verwendeten und sehr verschiedene Ergebnisse hinsichtlich seiner Aussagekraft zur Entitätenunterscheidung erzielten (siehe Tabelle 4, Kapitel 6.3.2.3). In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahre 2014 von Pelosi et al. wurde schließlich geschlussfolgert, dass das Ki-67 zwar einen interessanten Marker für die BP-NEN-

Klassifikation darstellt, jedoch noch zu viele Fragen offen bleiben und mehr Studien hierzu notwendig sind, um es in das Grading pulmonaler NEN fest zu integrieren (Pelosi et al. 2014a). So existiert bisher kein einheitliches Auswertungssystem der Ki-67-IHC-Färbungen, die IHC-Auswertung weist eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Pathologen auf und die ermittelten Cut-off-Werte zwischen den Entitäten variieren in den unterschiedlichen Studien stark. Aus diesem Grund wurde das Ki-67 2015 zwar erstmals als Empfehlung zusätzlich zur Mitosenbestimmung in die neue WHO-Klassifikation pulmonaler NEN aufgenommen, jedoch nur sehr grobe, lückenhafte Wertebereiche für die jeweiligen Entitäten angegeben (Schnabel und Junker 2015). Um diesen Sachverhalt zu eruieren, wurde anhand eines großen Patientenkollektivs aller BP-NEN-Entitäten das **Manuskript III** erstellt. Außerdem sollte darin außer auf das Ki-67 ein Augenmerk auf weitere potentielle Proliferationsmarker gelegt werden, die sich zur Differenzierung der BP-NEN-Entitäten eignen und eventuell Vorteile gegenüber dem Ki-67 aufweisen. Die Topoisomerasen sind in ihrer molekularen Funktionsweise weitgehend ergründet und stellen die Zielstruktur für eine Zytostatikatherapie mit Topoisomerase-Inhibitoren (Topoisomerasen I und II) oder Anthrazyklinen (Topoisomerase 2 alpha) dar. Anthrazykline gehören zur zytostatischen Standardtherapie von Brustkrebs, sodass hier neben dem HER2 auch die TOP2A als histopathologischer Marker zum Aufzeigen der Proliferationsfraktion eingeführt wurde, sodass spezifische Antikörper bereits verfügbar sind (Milde-Langosch et al. 2013). Die aktuelle *First-line*-Therapie von *high-grade* NEN besteht aus der Kombination einer Platin-basierten Chemotherapie mit Etoposid (Basu et al. 2015). Daher wurde die TOP2A als zweiter Marker für die vorliegende Arbeit interessant.

Den dritten im **Manuskript III** betrachteten Proliferationsmarker stellt das noch weitgehend unbekannte RacGAP1 dar. Gemäß einiger Studien zeigt es eine hohe prognostische Aussagekraft und könnte neben der Proliferationsaktivität weitere Aussagen zum biologischen Verhalten der BP-NEN (Migration, Invasion und Metastasierung) liefern (Ma et al. 2003, Rosty et al. 2005, Sanz-Moreno et al. 2008, Yamazaki et al. 2009, Wang et al. 2011, Ke et al. 2013, Liang et al. 2013, Milde-Langosch et al. 2013, Pliarchopoulou et al. 2013, Hazar-Rethinam et al. 2015, Imaoka et al. 2015, Saigusa et al. 2015, Yeh et al. 2015, Zhang et al. 2015). Einen auf RacGAP1 abzielenden therapeutischen Ansatz gibt es bislang nicht, allerdings existieren erste Hinweise dafür, dass eine RacGAP1-Inhibition zu antitumorösen Effekten führen könnte: Eine Studie von Chang et al. (2013) beschreibt ein aus dem Gemeinen Samtfußröbling (*Flammulina velutipes*, Speisepilz aus der Familie der *Physalacriaceae*) isoliertes Protein, namens FIP-ve, welches in ihren Untersuchungen die RacGAP1-mRNA- und Proteinexpression vermindern und dadurch die Zellmigration und Proliferation der Lungenkarzinomzelllinie A549 reduzieren konnte.

### 6.3.1 Expressionshäufigkeiten und -intensitäten von Ki-67, TOP2A und RacGAP1

Wie aus **Manuskript III** ersichtlich wird, steigt sowohl die Protein- als auch die mRNA-Expression aller drei betrachteten Proliferationsmarker von den gut-differenzierten TC zu den mäßig-differenzierten AC sowie von den AC zu den schlecht-differenzierten SCLC und LCNEC gemäß Mann-Whitney-Test signifikant an. Mit zunehmender Malignität erhöht sich somit erwartungsgemäß die Proliferationsaktivität. Um das Expressionsverhältnis zwischen den einzelnen Proliferationsmarkern darzustellen, wurde die Tabelle 3 erstellt. Sie zeigt die Mediane der immunhistochemischen Auswertung der manuell-visuellen Durchschnittsevaluierung (Prozentsatz positiver Zellkerne in 10 HPF bei 400-facher Vergrößerung) sowie die 40-dCt-Werte der qRT-PCR pro Marker in jeder Tumorentität.

**Tabelle 3: In der vorliegenden Arbeit ermittelte Mediane der Proliferationsmarker-Expression in den verschiedenen Entitäten der bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien.**

	Proliferationsmarker	TC (n)	AC (n)	SCLC (n)	LCNEC (n)
IHC	Ki-67-Durchschnitt	1,00 (24)	3,00 (21)	54,00 (50)	56,00 (7)
	TOP2A-Durchschnitt	0,50 (24)	3,00 (21)	50,00 (50)	48,00 (7)
	RacGAP1-Durchschnitt	2,00 (24)	5,00 (21)	39,50 (50)	32,00 (7)
qRT-PCR	Ki-67-mRNA	26,00 (18)	27,95 (15)	35,60 (43)	36,10 (7)
	TOP2A-mRNA	30,13 (18)	32,43 (15)	37,60 (43)	38,11 (7)
	RacGAP1-mRNA	28,45 (18)	30,30 (15)	33,05 (43)	34,03 (7)

Für die Ki-67-Protein-Expression wurden bereits vergleichbare Ergebnisse in vielen Studien beschrieben: Manche davon konnten einen signifikanten Anstieg von TC zu AC feststellen (Costes et al. 1995, Laitinen et al. 2000, Helpap und Kollermann 2001, Igarashi et al. 2004, Pelosi et al. 2005, Rugge et al. 2008, Skov et al. 2010, Grimaldi et al. 2011, Walts et al. 2012, Zahel et al. 2012, Warth et al. 2013, Swarts et al. 2014, Joseph et al. 2015), wohingegen andere nur Expressionszunahmen von *low-grade-* (TC / AC) zu *high-grade-* (SCLC / LCNEC) NEN verzeichnen konnten (Lin et al. 2003, Pelosi et al. 2003, Aslan et al. 2005, Li et al. 2011, Tsuta et al. 2011, Zheng et al. 2013). Wie in der vorliegenden Arbeit konnte auch bei Rindi et al. (2014), Pelosi et al. (2005), Igarashi et al. (2004) und Helpap et al. (2002) eine Zunahme der Ki-67-Protein-Level von TC zu AC und von AC zu SCLC / LCNEC festgestellt werden. Durch die meisten Studien wurden mit der vorliegenden Arbeit vergleichbare mediane Ki-67-Werte für TC (0,4-2,3%) ermittelt (Costes et al. 1995, Granberg et al. 2000, Arbiser et al. 2001, Helpap und Kollermann 2001, Igarashi et al. 2004, Aslan et al. 2005, Pelosi et al. 2005, Rugge et al. 2008, Skov et al. 2010, Tsuta et al. 2011, Zahel et al. 2012). In einigen Publikationen wurden auch etwas höhere Werte oder Wertebereiche (2,9-3,7%, < 25%) für diese Tumorentität beschrieben (Al-Khafaji et al. 1998, Van Eeden et al. 2002, Lin et al. 2003, Pelosi et

al. 2003, Grimaldi et al. 2011, Walts et al. 2012, Zheng et al. 2013). Bei den AC fanden sich in der Mehrheit der bereits genannten, vorhergehenden Arbeiten höhere Mediane (7-20%) als in der vorliegenden Untersuchung. Die durch Zahel et al. (2012), Skov et al. (2010), Helpap et al. (2001) und Costes et al. (1995) ermittelten Werte für AC (2,4-5,8%) ähneln dagegen dem der vorliegenden Arbeit.

Deutlich weniger Studien betrachteten die Ki-67-Expression in SCLC und LCNEC. Hier schwanken die bisher analysierten medianen Werte bei SCLC zwischen 42-87% und die der LCNEC zwischen 25-66,3% und schließen damit die der vorliegenden Arbeit ein (Arbiser et al. 2001, Helpap und Kollermann 2001, Van Eeden et al. 2002, Lin et al. 2003, Igarashi et al. 2004, Iyoda et al. 2004, Aslan et al. 2005, Pelosi et al. 2005, Skov et al. 2010, Tsuta et al. 2011, Zheng et al. 2013). Da BP-NEN, wie auch andere Neoplasien, eine hohe intra- und inter-tumorale Ki-67-Expressionsvariabilität aufweisen, ist die Patientenauswahl für die Ergebnisse mitentscheidend. Die Ki-67-Antikörper und -IHC-Färbungsprotokolle sowie die Ki-67-Auswertungsverfahren divergieren ebenfalls zwischen den verschiedenen Studien, sodass ein direkter Vergleich schwer ist und die Mediane nur als grobe Richtwerte betrachtet werden sollten. Auch wenn die IHC derzeit nicht ersetzt werden kann, geht der Trend in der Pathologie zunehmend in Richtung einer molekularbiologischen Diagnostik. Das **Manuskript III** liefert in dieser Hinsicht einen wesentlichen Beitrag, weil es erstmals die Ki-67-Expression in NEN auf mRNA-Ebene betrachtet.

Auch wenn sich die Ki-67-Expressionsraten geringfügig zwischen den Entitäten überlappen, sprechen die Aussagen des **Manuskriptes III**, ebenso wie andere Arbeiten, schlussendlich dafür, dass das Ki-67 für die Klassifikation der BP-NEN in TC, AC und SCLC / LCNEC angewendet werden kann (Helpap und Kollermann 2001, Igarashi et al. 2004, Pelosi et al. 2005, Rindi et al. 2014). Die letzten beiden Tumorentitäten sind durch ihre zellmorphologischen Merkmale (siehe Kapitel 2.1.3.1 bis 2.1.3.4) eindeutig voneinander abgrenzbar.

Im Vergleich zum Ki-67 liegen die Mediane der TOP2A-Protein-Expression etwas niedriger und die der mRNA-Level etwas höher. Ein niedrigerer Protein-Wert kann damit begründet werden, dass die TOP2A nur in der S-Phase, G2-Phase und M-Phase des Zellzyklus vorhanden ist, wohingegen das Ki-67-Antigen zusätzlich in der G1-Phase exprimiert wird. Dieser Unterschied macht sich vor allem bei den hochproliferativen Tumorentitäten bemerkbar, bei welchen viele Zellen erneut in einen aktiven Zellzyklus übergehen. Auf mRNA-Ebene erhöhte TOP2A-Werte (auch in TC und AC) sprechen für eine Vorbereitung der Tumorzellen auf den Eintritt in die S-, G2- und M-Phase und somit für eine erhöhte Proliferationsaktivität auf mRNA-Ebene. Unterschiede zwischen den TOP2A-Protein- und mRNA-Leveln können darin begründet sein, dass nicht jede mRNA in ein Protein translatiert wird.

Da das RacGAP1 vor allem nur in der G2- und M-Phase exprimiert wird, stellt es den untersuchten Proliferationsmarker mit der geringsten Expressionsintensität sowohl auf Protein-, als

auch auf mRNA-Ebene dar. Auch wenn es im Vergleich zu den anderen beiden betrachteten Proliferationsmarkern in TC und AC höher und in SCLC und LCNEC niedriger exprimiert wird, ermöglichen die Unterschiede zwischen den Entitäten trotzdem eine Abgrenzung untereinander.

### 6.3.2 Problematik der Ki-67-Auswertung

#### 6.3.2.1 Auswertungsmethoden

##### Immunhistochemie – Manuelle Auswertung

Für die Evaluierung der Ki-67-Expressionslevel stellt die IHC derzeit die Methode der Wahl dar. Fast alle Studien an BP-NEN, und auch an GEP-NEN, verwendeten dabei nach Antigen-demaskierung den monoklonalen Antikörperklon MIB-1 in Labor-abhängigen Verdünnungen (1 : 25 – 1 : 1800), welcher zu sehr spezifischen Antigenfärbungen in Paraffin-eingebettetem Gewebe führt (Pelosi et al. 2014a, Rindi et al. 2014, Swarts et al. 2014, Joseph et al. 2015). Nur in wenigen Arbeiten wurden Abweichungen von der vorausbeschriebenen Methodik durchgeführt oder ein polyklonaler Anti-Ki-67-Antikörper eingesetzt (Aslan et al. 2005, Tsuta et al. 2011, Walts et al. 2012).

Die Quantifizierung der Ki-67-IHC erfolgte vorwiegend durch das manuelle Auszählen Ki-67-positiver und negativer Tumorzellkerne. Daraus wurde der Ki-67-Labeling-Index (Ki-67-LI) als Prozentsatz Ki-67-exprimierender Zellen errechnet. Die Evaluierungsmethoden hierfür unterscheiden sich in den verschiedenen Studien jedoch stark voneinander. Die erste Problematik stellt dabei schon die Auswahl des betrachteten Tumorareals dar: In manchen Studien wurde der Prozentsatz positiver Zellkerne in einer gewissen Anzahl an HPFs (4 - 8) bei entweder 200-facher oder 400-facher Vergrößerung ermittelt (Walts et al. 2012, Zahel et al. 2012, Warth et al. 2013), andere hingegen untersuchten ihn in 1 mm<sup>2</sup> oder 2 mm<sup>2</sup> großen Arealen bei undefinierter oder 250-facher Vergrößerung (Costes et al. 1995, Van Eeden et al. 2002). Wart et al. (2013) analysierten das gesamte Präparat und weitere Autoren ermittelten den Ki-67-LI in einer bestimmten Anzahl von Tumorzellen, die von 400 bis 2000 Zellen je nach Studie variierte (Arbiser et al. 2001, Helpap und Kollermann 2001, Pelosi et al. 2003, Igarashi et al. 2004, Iyoda et al. 2004, Pelosi et al. 2005, Rugge et al. 2008, Skov et al. 2010, Grimaldi et al. 2011, Tsuta et al. 2011, Joseph et al. 2015). Auch die Auswahlkriterien für das entsprechende Tumorareal divergierten stark: Einige Arbeitsgruppen empfehlen dafür, nur die hochproliferativen Zonen mit der höchsten Ki-67-Positivität, die sogenannten Hotspots, auszuwerten (Helpap und Kollermann 2001, Pelosi et al. 2003, Pelosi et al. 2005, Tsuta et al. 2011, Walts et al. 2012, Zahel et al. 2012, Warth et al. 2013). Igarashi et al. (2004) suchten aus dem Tumor repräsentative Areale mit durchschnittlicher Ki-67-Intensität heraus, wohingegen weitere Stu-



dien randomisiert die betrachteten Felder auswählen (Costes et al. 1995, Iyoda et al. 2004) oder auch keine Angabe zu den Auswahlkriterien des entsprechenden Areals machten (Arbiser et al. 2001, Van Eeden et al. 2002, Rugge et al. 2008, Grimaldi et al. 2011, Joseph et al. 2015). Tsuta et al. (2011) werteten neben den Hotspot-Arealen zusätzlich sogar Coldspot-Areale aus, welche durch die geringste Dichte Ki-67-positiver Zellkerne gekennzeichnet sind. Aufgrund der Fülle der manuellen IHC-Auswertungsmöglichkeiten sollten im **Manuskript III** zwei wesentliche Methoden durchgeführt und auf Konkordanz miteinander verglichen werden. Hierfür wurden Ki-67-positive / -negative Zellkerne zum einen in 10 repräsentativen HPF mit durchschnittlicher Ki-67-Expression bei 400-facher Vergrößerung und zum anderen in Hotspot-Arealen mit insgesamt 2000 Zellen ausgezählt und der Ki-67-LI berechnet. Mittels beider Verfahren konnten ähnliche Ergebnisse mit einem eindeutigen Anstieg der Level von TC zu AC und von AC zu SCLC / LCNEC ermittelt werden. Im Vergleich stellte sich jedoch heraus, dass die Hotspot-Evaluierung gemäß Wilcoxon-Test zu signifikant höheren Werten in AC, SCLC und LCNEC führte, als die Evaluierung der durchschnittlichen Ki-67-Expression. Das ist darauf zurückzuführen, dass die mittel- bis hochgradigen Tumorentitäten durch höher proliferative Zonen gekennzeichnet sind. Die TC hingegen weisen grundsätzlich eine so geringe Proliferationsrate auf, dass im gesamten Präparat teilweise nur 1-5 Zellkerne Ki-67-positiv sind. Die Unterschiede zwischen den beiden manuellen IHC-Evaluierungsmethoden führen schließlich zu verschiedenen Cut-off-Werten zwischen den Entitäten, sodass für eine endgültige Aussage hierfür eine Standardisierung notwendig ist. Da die Mehrheit der bisherigen Studien eine Ki-67-Hotspot-Evaluierung wählte, sollte sich hierauf geeinigt werden, die Hotspot-Areale eines Tumors bei 400-facher Vergrößerung in insgesamt 2000 Zellen auszuzählen.

### **Immunhistochemie – Automatisierte Auswertung**

Da die Validität der manuellen Auswertung aufgrund ihrer subjektiven Beeinflussbarkeit sehr häufig infrage gestellt wird, wurden automatisierte Auswertungsverfahren entwickelt. Hierfür müssen die gefärbten IHC-Präparate zunächst eingescannt werden, um anschließend mit Hilfe von Software-Programmen diverser Anbieter den Anteil an positiven zu negativen Tumorzellkernen zu ermitteln. So existieren bereits sechs Studien, in welchen die Ki-67-Expression der histologischen Präparate von v.a. TC und AC aber auch LCNEC mit unterschiedlichen Programmen in einer digitalen Bildanalyse automatisiert ausgewertet wurden (Costes et al. 1995, Walts et al. 2012, Warth et al. 2013, Liu et al. 2014, Rindi et al. 2014, Swarts et al. 2014, Joseph et al. 2015). Die Mediane der automatisierten Auswertung unterscheiden sich jedoch von denen der manuellen Auswertung: in den meisten Studien wurden wesentlich niedrigere, in manchen gleiche und seltener auch höhere Ki-67-Expressionsraten als durch die Auszählung eines Pathologen ermittelt, was u.a. stark von der jeweils verwendeten Software abhängt. Manche Programme betrachten nur die Relation des gefärbten Areals zum ungefärbten Anteil, wohingegen andere auch die Tumorzellen selbst erkennen können,

wobei hierbei wiederum die Gefahr der Verwechslung mit Normalgewebe entsteht. Auch die Erfassungsgrenze der Färbungsintensität divergiert in Abhängigkeit von der verwendeten Software, sodass schlussendlich auch hier keine Einheitlichkeit der Auswertung vorliegt. Das in **Manuskript III** verwendete Programm der DEFINIENS AG München wurde für die Ki-67-Evaluierung in der vorliegenden Arbeit erstmals in NEN verwendet. Es erkennt Tumorzellen und unterscheidet zwischen Färbungsintensitäten in 5 Abstufungen (ungefärbt, sehr schwach, schwach, mäßig oder stark gefärbt). Da eine Tumorzelle entweder nur proliferieren kann oder nicht, wurden Färbungsintensitäten in der vorliegenden Arbeit nicht differenziert betrachtet. Antikörper führen aber gelegentlich zu Artefakten, weshalb in der vorliegenden Arbeit sehr schwache Färbungen zu negativen Zellen addiert und schwache, mäßige und starke Färbungen summiert als positiv gewertet wurden. Auch wenn die so ermittelten Ki-67-LI pro Präparat deutlich niedriger ausfielen als die der manuellen Evaluierungsmethoden, verhalten sich die Relationen zwischen beiden Auswertungsmöglichkeiten gleich und es ist in allen Fällen ein signifikanter Anstieg der Werte zu den schlechter differenzierten Entitäten hin zu verzeichnen. Die in der automatisierten Auswertung ermittelten geringeren Expressionslevel werden in der Literatur auch häufig dadurch begründet, dass der Hauptaugenmerk der visuell-manuellen Begutachtung durch den Betrachter auf die positiven Zellkerne gelegt wird, was wiederum mit einer Überbewertung der Präparate verbunden ist (van Velthuysen et al. 2014a, Joseph et al. 2015). Dieser Fakt könnte sich auch auf die Areal-Auswahl in der manuellen Evaluierung ausgewirkt haben: Im Gegensatz zur automatisierten Auswertung, welche das gesamte Präparat berücksichtigte, wurden bei der Ki-67-Durchschnittsanalyse nur 10 HPF und bei der Hot-spotanalyse nur 2000 Zellen pro Tumorseite betrachtet. Im **Manuskript III** wurden erstmals SCLC vollautomatisiert ausgewertet, was durch die histologischen Merkmale dieser Tumorentität eine besondere Herausforderung darstellt. Diese entdifferenzierten Neoplasien sind durch Quetschartefakte, Nuclear Molding und große nekrotische Areale gekennzeichnet, sodass die Erkennung einzelner Tumorzellen erschwert ist. Nichtsdestotrotz stimmen die Relationen mit den anderen betrachteten Methoden sehr gut überein und die automatisierte Ki-67-Auswertung korreliert gemäß der Spearman-Rangkorrelation hochsignifikant mit der Ki-67-Durchschnittsevaluierung ( $\rho_{sp}=0,851$ ,  $p<0,001$ ,  $n=102$ ), der Ki-67-Hotspotevaluierung ( $\rho_{sp}=0,840$ ,  $p<0,001$ ,  $n=102$ ) und der Ki-67-PCR ( $\rho_{sp}=0,746$ ,  $p<0,001$ ,  $n=82$ ).

### **Real-time RT-PCR**

Die Real-time RT-PCR ist ein Verfahren, welches in den letzten Jahren in der routinopathologischen Diagnostik stark an Bedeutung gewonnen hat. Nach der Makrodissektion des Tumorseite eines Präparates erlaubt sie zwar nicht die genaue Lokalisation eines Markers, aber die objektive Quantifizierbarkeit auf mRNA-Ebene. Diverse Marker können aus einer Probenaufbereitung in einem Gang schnell analysiert und somit das biologische Verhalten des Tumors auf mRNA-Ebene erfasst werden. Diese Methodik hat in der Analyse der Ki-67-mRNA-

Expressionslevel bereits einen Stellenwert, um die verschiedenen Subgruppen an Mammakarzinomen voneinander abzugrenzen (Skarlos et al. 2012, Milde-Langosch et al. 2013). Für NEN wurde sie bisher nicht in Betracht gezogen, sodass deren Verwendbarkeit in BP-NEN im **Manuskript III** geprüft werden sollte. Dabei ergaben sich in der Spearman-Rangkorrelation sehr hohe Übereinstimmungen mit den immunhistochemischen Evaluierungsmethoden ( $\rho_{sp}=0,746-0,812$ ,  $p<0,001$ ,  $n=82$ ), sodass davon ausgegangen werden kann, dass sich Protein- und mRNA-Ebene bezüglich der Ki-67-Expression gleichartig verhalten. Wenn durch eine Normalisierung / Standardisierung labor-bedingte Unterschiede in den ermittelten mRNA-Werten ausgeglichen werden können, stellt die qRT-PCR ein sehr vielversprechendes Verfahren für die Ki-67-Evaluierung in Hinblick auf das Grading und die Differenzierung der BP-NEN dar.

#### 6.3.2.2 Untersucher-bedingte Variabilität der immunhistochemischen Auswertung

Die manuell-visuelle immunhistochemische Evaluierung der Ki-67-Expression ist, wie bereits beschrieben, stark Untersucher-abhängig. So existieren bereits einige Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass ein und dasselbe Präparat sowohl zwischen verschiedenen renommierten Pathologen unter gleichen Bedingungen, als auch von dem gleichen Pathologen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Rahmen einer Reevaluierung verschiedene Ki-67-LI ergab (Mengel et al. 2002, Walts et al. 2012, Warth et al. 2013, Swarts et al. 2014, van Velthuysen et al. 2014a). Einschätzungsschwankungen kommen vor allem dadurch zustande, dass die Färbungsintensität selbst unterschiedlich ausgeprägt ist: Manche Tumore zeigen trotz Ki-67-Expression generell nur eine schwache Immunreaktivität (gewebeabhängig) und andere weisen Intensitätsabstufungen auf, welche in der jeweiligen Anschnittsebene der Zellkerne im entsprechenden Präparat begründet sein könnten. Wie aber u.a. durch Swarts et al. (2014) und Warth et al. (2013) belegt werden konnte, ist diese Variabilität zwischen Untersuchern / Untersuchungen bei der Auszählung der Mitoserate in NEN deutlich höher als bei der Ki-67-Evaluierung. Im Gegensatz zu gefärbten Zellkernen kann das Bild der Mitosen sehr variabel sein und bereitet selbst einem geübten Auswerter mitunter Schwierigkeiten.

Neben der subjektiven Beeinflussung der Auswertung kommt erschwerend eine inter- und intratumorale Variabilität der Ki-67-Expression hinzu. Schon aneinandergrenzende Schnitte (4  $\mu\text{m}$  dick) eines Tumors können unterschiedliche Expressionsraten aufweisen, da sich in vielen Tumoren vor allem Proliferationsfronten und höher proliferative Areale ausbilden (Singh et al. 2014). Aus diesem Grund wird auch nicht unberechtigt die Validität der Ermittlung der Expressionsrate eines Tumors anhand einer Biopsie in Frage gestellt (Pelosi et al. 2014a). Diverse Studien verglichen jedoch die ermittelten Ki-67-LI zwischen Biopstaten und dazu gehörigen Resektaten und befürworteten anschließend trotzdem die weitere Verwendung von Pro-

beexzisaten zur ersten Ermittlung der Proliferationsaktivität eines Tumors (Viberti et al. 1997, Aslan et al. 2005, Pelosi et al. 2005, Zheng et al. 2013).

Im **Manuskript III** der vorliegenden Arbeit wurden die gleichen Präparate von 22 randomisiert gewählten SCLC-Patienten durch zwei unabhängige Untersucher verblindet auf die Ki-67-Durchschnittsexpression hin ausgewertet und eine sehr gute Korrelation zwischen beiden Bewertern festgestellt. Dabei wurden SCLC gewählt, weil sie neben den LCNEC die Tumorgruppe mit der höchsten Spanne in der Proliferationsrate darstellen. Diese wurden mit Hilfe der Ki-67-Durchschnittsevaluierung bewertet, da diese Methode nicht allein nur durch das Zählen und die Schwankungen in den Färbungsintensitäten, sondern auch durch die Auswahl der 10 nach dem Empfinden des jeweiligen Untersuchers repräsentativen HPFs bereits subjektiv beeinflusst wird.

Im Vergleich zu anderen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit (i.) nur von einem kleinen Kollektiv, (ii.) von nur zwei Bewertern und (iii.) zu nur jeweils einem Zeitpunkt eine Auswertung vorgenommen (Mengel et al. 2002, Walts et al. 2012, Warth et al. 2013, Swarts et al. 2014). Ebenso konnte, im Gegensatz zu anderen Studien, kein Cohens Kappa zur Überprüfung der Interrater-Reliabilität evaluiert werden, da dieser eine nominale oder ordinale Datenverteilung erfordert und die Ki-67-LI metrisch skaliert sind. Eine über den Ki-67-LI ermittelte Zuordnung zu den Tumorgaden mit anschließender Cohens Kappa-Berechnung hätte über definierte Cut-off-Werte zwischen den Entitäten erfolgen müssen, deren Festlegung selbst jedoch eine Kernfrage des **Manuskriptes III** darstellte. Auch würde diese einen Informationsverlust mit sich bringen. Nichtsdestotrotz spricht der im Wilcoxon-Test ermittelte nicht signifikante Unterschied zwischen den beiden Untersuchern für eine geringe Variabilität der Auswertung und dient gleichzeitig als Beweis für die Validität der manuell-visuellen Ki-67-Auswertung der vorliegenden Arbeit.

### 6.3.2.3 Cut-off-Werte zur Abgrenzung der Entitäten

Alle bisherigen Studien, welche basierend auf der Ki-67-Expression einen Cut-off-Wert zwischen einzelnen oder allen Entitäten der BP-NEN errechneten, sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Aus dieser geht hervor, dass es keine Einheitlichkeit in den ermittelten Grenzwerten zwischen den Entitäten gibt und sich diese für TC zwischen  $< 2,5\%$  bis  $< 10\%$ , für AC zwischen  $4\%$  und  $50\%$  und für SCLC / LCNEC zwischen  $> 20\%$  und  $> 50\%$  bewegen. Manche Studien unterscheiden sogar nur zwischen *low-grade* und *high-grade* NEN, weil sie keine Unterschiede in der Ki-67-Expression zwischen TC und AC feststellen konnten. Diese Differenzen zwischen den einzelnen Studien können auf verschiedenen Faktoren beruhen: Die Probenauswahl hat einen Einfluss auf die ermittelten Expressionsraten. Andererseits ist auffällig, dass gerade die Studien, die einen hohen Wert oder auch keine Unterschiede zwischen TC und AC verzeichnen konnten, nur sehr kleine Probenzahlen an BP-NEN betrachteten (Al-

Khafaji et al. 1998, Van Eeden et al. 2002, Lin et al. 2003). Gemäß einer Untersuchung von Mengel et al. (2002) treten aber auch Labor-abhängige Unterschiede in dem Ausmaß auf, dass die selben Präparate mit den gleichen verwendeten Antikörpern zu unterschiedlichen Färbungsintensitäten bis hin zu unterschiedlichen Anzahlen positiver Zellkerne führten. In den letzten Jahren ist das immunhistochemische Protokoll für die Ki-67-Färbung jedoch besser standardisiert worden, sodass diese Interlabor-Variabilität nur noch bei älteren Studien, ansonsten aber geringe Einflüsse haben dürfte.

**Tabelle 4: Zusammenfassung der Literatur zu Untersuchungen der Ki-67-Expression in bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien in Bezug auf Cut-off-Werte zwischen den Entitäten.**

Autor	Tumorentität	Detektionsmethode	Cut-off-Werte
Costes et al. (1995)	TC (31), AC (16)	IHC, automatisiert gezählt	TC < 4%
Al-Khafaji et al. (1998)	TC (6), AC (5)	IHC, manuell gezählt	TC < 10% AC ≤ 50%
Van Eeden et al. (2002)	TC (4), AC (4), LCNEC (2)	IHC, manuell gezählt	TC, AC < 25% LCNEC > 25%
Pelosi et al. (2003)	TC (35), AC (23), LCNEC (40), SCLC (27)	IHC, manuell gezählt	TC, AC < 5% SCLC, LCNEC > 55%
Lin et al. (2003)	63 GEP-NEN und BP-NEN	IHC, manuell gezählt	<i>low-grade</i> NEN < 25% <i>high-grade</i> NEN > 50%
Pelosi et al. (2005)	TC (3), AC (9), SCLC (9)	IHC, manuell gezählt	TC, AC < 20% SCLC > 20%
Rugge et al. (2008)	TC (58), AC (9)	IHC, manuell gezählt	TC < 5,4%
Skov et al. (2010)	TC (48), AC (15), LCNEC (27), SCLC (186)	IHC, manuell gezählt	TC < 3% AC > 3% LCNEC: Mean=25,6% SCLC: Mean=41,8%
Grimaldi et al. (2011)	TC (75), AC (31)	IHC, manuell gezählt	TC < 4%
Zahel et al. (2012)	TC (111), AC (82)	IHC, manuell gezählt	TC < 2,5% (Durchschnitt) TC < 5,8% (Hotspot)
Walts et al. (2012)	TC (78), AC (31)	IHC, automatisiert gezählt	TC < 5%
Liu et al. (2014)	TC (39), AC (7), LCNEC (9)	IHC, automatisiert gezählt	TC < 7% AC 7-50% LCNEC > 50%
Rindi et al. (2014)	TC (113), AC (84), SCLC (108), LCNEC (94)	IHC, manuell und automa- tisiert gezählt	TC < 4% AC 4- < 25% SCLC, LCNEC ≥ 25%
Singh et al. (2014)	TC, AC, SCLC, LCNEC (n=unbekannt)	IHC, manuell gezählt	TC < 3% AC 3-20% SCLC > 20%
Swarts et al. (2014)	TC (98), AC (16)	IHC, automatisiert gezählt	TC < 5%
van Velthuysen et al. (2014a)	TC (8), AC (7), LCNEC (3)	IHC, manuell und automa- tisiert gezählt	TC < 3% AC 3-20% SCLC > 20%



Für die Wahl definierter Grenzwerte ist die Auswertungsmethodik der IHC-Färbung ebenfalls bedeutend, was gut durch das **Manuskript III** ersichtlich wird. Wie auch bei Zahel et al. (2012) beschrieben, unterscheiden sich die in der vorliegenden Arbeit manuell-visuell ermittelten Cut-off-Werte der ausgezählten Ki-67-Durchschnittsevaluierung von denen der Ki-67-Hotspot-Auswertung. Noch auffälliger ist ihr Unterschied zu der vollautomatisierten digitalen Bildanalyse der Ki-67-Färbung. Bei letzterer wurden deutlich niedrigere Cut-off-Werte ermittelt, wofür mögliche Ursachen bereits oben diskutiert wurden. Die manuell-visuellen Evaluierungsmethoden des **Manuskriptes III** zeigen für die Abgrenzung zwischen TC und AC sowie zwischen AC und SCLC / LCNEC ähnliche Grenzwerte, wie sie auch von Singh et al. (2014), van Velthuysen et al. (2014b), Zahel et al. (2012) und Pelosi et al. (2005) bereits beschrieben wurden. Damit entsprechen sie auch den Grenzwerten für die Einteilung der GEP-NEN in G1-, G2- und G3-NEN gemäß WHO-Definition (Richards-Taylor et al. 2015). Nichtsdestotrotz ist eine Standardisierung der Auswertung zur Festlegung der optimalen Ki-67-Cut-off-Werte zwischen den BP-NEN-Entitäten erforderlich. Durch die fließenden Übergänge der Entitäten, die Laborabhängigkeit der Färbung und die subjektive Beeinflussung der Auswertung wird es trotz festgelegter Grenzen immer einen Graubereich geben. Mit einem dreifach-gestützten Gradingssystem, was ergänzend zur Ki-67-Expression auch die mitotische Aktivität, das Ausmaß an nekrotischen Arealen und das morphologische Bild des Tumorpräparates berücksichtigt, kann dieser gut überwunden werden (Rindi et al. 2014, Joseph et al. 2015).

Das **Manuskript III** ist die erste Studie, in welcher Ki-67-mRNA-Level in BP-NEN analysiert wurden und in der eindeutige Cut-off-Werte zwischen den Entitäten ermittelt wurden.

### 6.3.3 TOP2A als prädiktiver Biomarker in BP-NEN

Dass die TOP2A nicht nur in Brustkrebs, sondern auch in anderen Tumoren überexprimiert sein kann, wurde bereits in einigen Publikationen gezeigt (Dingemans et al. 1998, Dingemans et al. 2001, Fountzilias et al. 2012, de Resende et al. 2013, Yang et al. 2013, Parker et al. 2014). Hierbei können hohe TOP2A-Level mit einer erhöhten Proliferationsaktivität, einem Verlust der histologischen Differenzierung und einem aggressiveren Verhalten des Tumors mit entsprechend schlechteren Überlebensraten assoziiert werden. Auch in den BP-NEN konnten im **Manuskript III** mit zunehmender Verminderung des Differenzierungsgrades ansteigende Werte sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene nachgewiesen und kaum Überlappungen im Ausmaß der Expression zwischen den verschiedenen Entitäten aufgezeigt werden. Somit ergab die ROC-Analyse auch valide Cut-off-Werte zwischen den pulmonalen *low-grade*, *intermediate-grade* und *high-grade* NEN. Wie auch durch andere Arbeitsgruppen beschrieben, wurden dabei hochsignifikante Korrelationen mit der Ki-67-Expression (IHC:  $\rho_{sp}=0,896$ ,  $p<0,001$ ,  $n=99$ ; qRT-PCR:  $\rho_{sp}=0,907$ ,  $p<0,001$ ,  $n=83$ ) festgestellt (Fountzilias et al.

2012, Meng et al. 2012, de Resende et al. 2013, Yang et al. 2013). Auch wenn in SCLC die TOP2A-Expressionsintensität bereits in einigen Studien im Zusammenhang mit einem therapeutischen Ansprechen auf eine TOP2-basierte Chemotherapie untersucht wurde (Binaschi et al. 1992, Withoff et al. 1994, Campling et al. 1997, Syahrudin et al. 1998, Dingemans et al. 1999, Rijavec et al. 2011, Gray et al. 2012), existiert keine Datenlage zur TOP2A-Expression in allen BP-NEN-Entitäten sowie im Bezug auf ihren diagnostischen Stellenwert zur Ermittlung des Ausmaßes der Proliferationsrate und zur Abgrenzung der Entitäten. Dabei zeigt sie gerade als Target für therapeutische Interventionen einen direkten prädiktiven Vorteil gegenüber dem Ki-67: Hohe Werte, wie sie in SCLC und LCNEC auftreten, stehen für eine gute Ansprechbarkeit auf eine TOP2-abzielende Therapie, wohingegen bei niedrigeren TOP2A-Expressionsleveln (üblicherweise bei TC, aber auch bei AC) kein Ansprechen zu erwarten ist. So ist es nicht verwunderlich, dass Etoposid als TOP2-Inhibitor in Kombination mit Cisplatin die *First-Line*-Therapie des SCLC darstellt und in der Effektivität auch nicht durch die TOP1-Inhibitoren Irinotecan oder Topotecan übertroffen werden kann (Kubota et al. 2014, Shi et al. 2015). Weiterhin zeigt auch das TOP2-inhibierende Anthrazyklin Amrubicin verhältnismäßig gute Behandlungserfolge bei SCLC-Patienten (Gray et al. 2012, Horita et al. 2016).

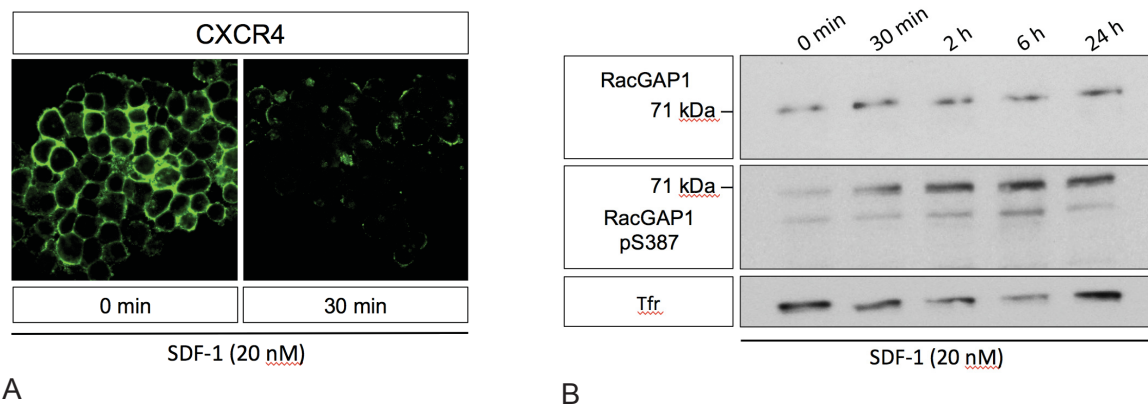
In der vorliegenden Arbeit wurde die TOP2A-IHC ausschließlich in der manuellen Durchschnitts-Evaluierung ermittelt, um zunächst die Anwendbarkeit zu testen und eine bessere Vergleichbarkeit zur qRT-PCR zu ermöglichen. Beide Methoden lieferten durch eine hohe Konkordanz valide Ergebnisse und eignen sich somit für diagnostische Zwecke zur Bestimmung der Proliferationsrate und schließlich zur Abgrenzung der Entitäten.

#### 6.3.4 RacGAP1 als Marker für Invasivität

Ebenso wie beim Ki-67 und bei der TOP2A konnte im **Manuskript III** auch ein Anstieg der RacGAP1-Protein- und mRNA-Expression von den TC über die AC zu den SCLC / LCNEC hin festgestellt werden. Auch wenn dieses Rho-GAP unter den betrachteten Markern die geringste Expressionsintensität aufweist, ist die Spannweite dennoch groß genug, um in der ROC-Analyse spezifische und sensitive Cut-off-Werte zwischen den BP-NEN-Entitäten in der IHC und qRT-PCR zu definieren. Da für die IHC bisher nur ein monoklonaler Anti-RacGAP1-Antikörper kommerziell erhältlich ist, welcher in Probefärbungen aber ernüchternde Ergebnisse lieferte, wurde für die vorliegende Arbeit ein polyklonaler Antikörper verwendet. Er zeigte bei der Antikörpertestung die spezifischsten Färbungsergebnisse und konnte mit dem zur Immunisierung der Tiere verwendeten Peptid, welches von der herstellenden Firma zur Verfügung gestellt wurde, neutralisiert werden. Außerdem wies er über diese Arbeit hinaus auch im Western Blot und in der Immunocytochemie in BP-NEN-Zelllinien spezifische Immunsignale auf. Neben der vorwiegend nukleären Färbung zeigte sich in der RacGAP1-IHC teilweise

auch eine zytoplasmatische Reaktivität in den Tumorzellen (auch durch Wang et al. (2011), Liang et al. (2013), Imaoka et al. (2015) beschrieben). Diese könnte darin begründet sein, dass RacGAP1 neben der Beteiligung an der Zytokinese auch in zahlreiche andere zelluläre Funktionen, wie u.a. die Aufrechterhaltung der Integrität der Adhäsionsverbindungen oder die Beeinflussung der Zellmigration, involviert ist (siehe Einleitung) (Yamazaki et al. 2009, Ratheesh et al. 2012, Jacquemet et al. 2013). Auch wenn die vielen einzelnen Studien zum RacGAP1 noch kein Gesamtbild über dessen Funktionen geben, wird aus vielen Arbeiten eindeutig ersichtlich, dass es starke Tumor-promovierende Effekte und eine hohe prognostische Aussagekraft besitzt. So wird seine Expression in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, kolorektalen und gastrischen Karzinomen, HCC, NSCLC, Melanomen, Zervixkarzinomen, Mammakarzinomen und Meningeomen mit einem aggressiven Tumorverhalten und einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht (Ma et al. 2003, Rosty et al. 2005, Wang et al. 2011, Ke et al. 2013, Liang et al. 2013, Milde-Langosch et al. 2013, Pliarchopoulou et al. 2013, Chen et al. 2015, Hazar-Rethinam et al. 2015, Imaoka et al. 2015, Saigusa et al. 2015, Zhang et al. 2015). Auch in der vorliegenden Arbeit war bei vielen Patienten eine höhere Expressionsintensität in der invasiven Front des Tumors auffällig. Diese Patienten zeigten schließlich ungünstigere Überlebensraten. Obwohl das RacGAP1 eine starke, hochsignifikante Korrelation mit der Expression des Ki-67 und der TOP2A aufwies, konnte auch beim Vergleich zwischen SCLC mit guter und schlechter Prognose eine Überlegenheit gegenüber den anderen beiden Markern hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft festgestellt werden: Das RacGAP1 war das einzige Protein, welches in den betrachteten SCLC mit schlechter Prognose höher exprimiert war, als in denen mit guter Prognose. Beim gleichen Kollektiv konnten über diese Arbeit hinaus ähnliche Ergebnisse für den Chemokinrezeptor CXCR4 gezeigt werden. Somit war der Anlass gegeben, einen Zusammenhang zwischen CXCR4 und RacGAP1 im Zellmodell zu untersuchen: Nach einer Stimulation der CXCR4-exprimierenden SCLC-Zelllinie NCI-H69 mit dem endogenen CXCR4-Liganden *Stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) konnte mit einem phosphospezifischen Anti-RacGAP1-Antikörper für das Serin 387 (S387) ab 30 Minuten eine Zunahme der RacGAP1-Phosphorylierung festgestellt werden (siehe Abbildung 19). Daraus kann geschlossen werden, dass die durch die Aurora B-Kinase gesteuerte RacGAP1-Phosphorylierung am S387 über die CXCR4 / SDF-1-Achse induziert wird, um schließlich Rac1 zu inaktivieren und RhoA zu aktivieren. Um die Konsequenzen hieraus zu verstehen, muss an diesem Punkt jedoch zukünftig weiter angesetzt werden.

Auch wenn das RacGAP1 im **Manuskript III** erstmals in BP-NEN (bzw. NEN überhaupt) untersucht wurde, scheint es einen neuen Marker mit großem Potential hinsichtlich der diagnostischen und prognostischen Aussagekraft sowie einen potentiellen therapeutischen Ansatzpunkt darzustellen.



**Abbildung 19: RacGAP1 und CXCR4 in NCI-H69-Zellen.**

**A** – Immuncytochemie. Die Zelllinie NCI-H69 (Originalvergrößerung: 63x10) exprimiert endogen den CXCR4-Rezeptor. Vor Behandlung (links) zeigt der CXCR4 eine membranständige Färbung, welche nach 30-minütiger Behandlung mit SDF-1 (20 nM) internalisiert (rechts). Diese Internalisierung dient als Nachweis der Ligandenbindung des SDF-1 an den CXCR4. Anti-CXCR4-Antikörper: UMB-2 (1:2); Sekundär-Antikörper: Alexa-488-gekoppelter Anti-Kaninchen IgG.

**B** – Western Blot. Totales RacGAP1 und am Serin 387 phosphoryliertes RacGAP1 in NCI-H69-Zellen nach Inkubation mit SDF-1 (20 nM). Bereits nach 30-minütiger Behandlung ist die Phosphorylierung am S387 des RacGAP1 im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Der Transferrin-Rezeptor (Tfr) dient als Ladekontrolle. Anti-RacGAP1-Antikörper: HPA043912 (1:150), Atlas Antibodies; Anti-RacGAP1-pS387-Antikörper: ab61078 (1:500), Abcam; Anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper: Abcam (1:2000). Detektion mittels Meerrettichperoxidase-Reaktion. Repräsentativer Western Blot von insgesamt zwei Experimenten.

### 6.3.5 Korrelation der Proliferationsmarker mit klinischen und histopathologischen Patientendaten

Eine erhöhte Proliferationsaktivität spricht für eine bessere Ansprechbarkeit auf antiproliferative Chemotherapeutika sowie für einen höheren  $^{18}\text{F}$ -FDG-Uptake im PET/CT (Singh et al. 2014, Basu et al. 2015). Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass 17 Patienten (davon 12 mit SCLC) eine Chemotherapie und 12 Patienten (davon 9 mit SCLC) eine Radiotherapie vor der Tumoresektion erhalten haben. Schließlich wurde verglichen, inwiefern sich die Expressionslevel der drei Proliferationsmarker in den behandelten Patienten von denen der unbehandelten Patienten unterschieden. Es konnten dabei, mit Ausnahme der digitalen Bildanalyse des Ki-67 in SCLC-Patienten, keine Expressionsunterschiede zwischen den betrachteten Gruppen festgestellt werden. Dass bei den Präparaten der behandelten SCLC-Patienten in der digitalen Bildanalyse des Ki-67 niedrigere Expressionslevel beobachtet wurden als bei den unbehandelten, könnte darin begründet sein, dass die Zellkernform nach Behandlung verändert war, sodass diese vom Auswertungssystem nicht mehr als solche erkannt wurden.

Ob das menschliche Auge hier einen Unterschied übersieht oder das automatisiert auswertende Programm nicht korrekt zählt, bleibt offen.

Bei allen betrachteten Proliferationsmarkern korrelierten die Protein- und mRNA-Level hochsignifikant mit dem Grading nach der UICC ( $\rho_{sp}=0,721-0,861$ ;  $p<0,001$ ). Da diese Evaluierung des Tumorgades derzeit noch auf der Auszählung der Mitoserate basiert, konnten hier ebenfalls signifikante Zusammenhänge mit der Expression der Proliferationsmarker festgestellt werden (siehe **Manuskript III**). Eine Ausnahme dabei bildet jedoch die digitale Bildanalyse des Ki-67, welche trotz starker Korrelation mit der Protein- und mRNA-Expression aller weiteren Marker, keinen signifikanten Zusammenhang mit der Mitoserate zeigte. Die manuellen immunhistochemischen Ki-67-Evaluierungsmethoden und die Ki-67-qRT-PCR ergaben hingegen sehr hohe Spearman-Rangkorrelations-Werte. Auch wenn die Mitoserate nur die M-Phase des Zellzyklus repräsentiert, werden das RacGAP1 in der G2- und M-Phase, die TOP2A in der S-, G2- und M-Phase und das Ki-67 sogar in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert. Diese Unterschiede wirken sich nur geringfügig auf die Expressionsintensität aus und haben keine Effekte auf Korrelationen mit klinischen Daten und der diagnostischen Aussagekraft.

Sowohl für die Ki-67-Expression, als auch für die TOP2A- und RacGAP1-Expression konnten signifikante Korrelationen zum T- und N-Stadium der TNM-Klassifikation festgestellt werden. Dieser Zusammenhang mit dem Ausmaß der Tumorausdehnung wurde für alle drei Marker in der Literatur bereits beschrieben (de Resende et al. 2013, Ke et al. 2013, Lan et al. 2014, Miller et al. 2014, Parker et al. 2014, Imaoka et al. 2015, Saigusa et al. 2015).

Von 17 der 104 betrachteten Patientenproben lagen nur die Metastasen und nicht die Primärtumore als FFPE vor, sodass hier auf Unterschiede zwischen den beiden Gruppen geprüft werden konnte: Dabei ergab sich, dass auf Proteinebene keine Expressionsunterschiede zwischen Filiae und Primaria zu verzeichnen waren, wohingegen sich bei allen Proliferationsmarkern höhere mRNA-Werte in den Metastasen im Vergleich zu den Primärtumoren zeigten, die im Falle des Ki-67 sogar signifikant waren. Auf mRNA-Ebene scheint die Proliferationsaktivität in Tochtergeschwülsten somit erhöht zu sein. Diese Aussage sollte jedoch an einem größeren Kollektiv, bevorzugt mit Primärtumoren und Metastasen der selben Patienten, nochmals bestätigt werden.

Dass eine hohe Ki-67-Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert wird, ist bekannt (Liu et al. 2014, Singh et al. 2014, Swarts et al. 2014, Richards-Taylor et al. 2015). Aus diesem Grund wurde es überhaupt als Proliferationsmarker für das Grading interessant (Singh et al. 2014). Auch die TOP2A wird bei einer erhöhten Expressionsrate mit einem aggressiveren Tumorverhalten, einer ungünstigen Prognose und histologischer Entdifferenzierung in den verschiedensten Tumorentitäten (NSCLC, Mammakarzinome, urogenitale Karzinome, nasopharyngeale Karzinome, Kehlkopftumore u.a.) in Verbindung gebracht (de Resende et al.



2013, Han et al. 2013, Lan et al. 2014, Mrklic et al. 2014, Huang et al. 2015). Diese Zusammenhänge konnten auch in BP-NEN im **Manuskript III** der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Im Vergleich zu den anderen beiden Markern stellte sich jedoch das RacGAP1 hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft als noch günstiger heraus: Es war der einzige Marker, bei welchem die Proteinlevel negativ mit der Prognose korrelierten und welcher in SCLC-Patienten mit schlechter Prognose signifikant höher exprimiert war, als in denen mit guter Prognose. Dass eine erhöhte RacGAP1-Expression an der invasiven Front mit einem negativen Krankheitsverlauf assoziiert ist, wurde ebenfalls durch Saigusa et al. (2015) publiziert. Auch wird für dieses Protein beschrieben, dass seine Überexpression in diversen Malignitäten mit erhöhter Angioinvasion, Lymphknoteninvasion, Fernmetastasierung sowie geringerem progressionsfreien Überleben zusammenhängt (Wang et al. 2011, Ke et al. 2013, Hazar-Rethinam et al. 2015, Imaoka et al. 2015, Saigusa et al. 2015). Wie bereits durch andere Arbeitsgruppen beschrieben worden war, konnte daher auch in der vorliegenden Arbeit für alle drei Marker in der Kaplan-Meier-Analyse bestätigt werden, dass höhere Protein- und mRNA-Expressionslevel mit kürzeren Patienten-Überlebenszeiten assoziiert sind (Wang et al. 2011, Fountzilias et al. 2012, Meng et al. 2012, de Resende et al. 2013, Ke et al. 2013, Martin-Perez et al. 2013, Lan et al. 2014, Parker et al. 2014, Pelosi et al. 2014b, Rindi et al. 2014, Swarts et al. 2014, van Velthuysen et al. 2014b, van Velthuysen et al. 2014a, Hazar-Rethinam et al. 2015, Imaoka et al. 2015, Richards-Taylor et al. 2015, Saigusa et al. 2015).

### 6.3.6 Proliferationsmarker-Expression im Vergleich zwischen Immunhistochemie und qRT-PCR

Da die IHC im routinopathologischen Alltag eine unentbehrliche Methodik ist, die PCR aber an Bedeutung gewinnt, sollten nicht nur für die SSTR-Expression, sondern auch für die betrachteten Proliferationsmarker beide Methoden miteinander verglichen werden. Für alle drei Marker konnten in der Spearman-Rangkorrelation sehr hohe Übereinstimmungen zwischen beiden Detektionsmethoden festgestellt werden, obwohl in der qRT-PCR die gesamten Schnitte und in der IHC nur gewisse Tumorareale (10 HPF, 2000 Zellen oder gesamter Tumoranteil) betrachtet wurden.

Für das Ki-67 gibt es unzählig viele Studien zur Problematik der Auswertbarkeit der Proteinexpression in NEN, aber keine Literatur zu den mRNA-Leveln. Laut **Manuskript III** und anderen Arbeiten in Brustkrebs, Mantelzell-Lymphomen und Gastrointestinalen Stromatumoren eignet sich die Ki-67-mRNA aber hervorragend zur Stratifizierung oder Abgrenzung zwischen unterschiedlichen Tumorgaden (Brizova et al. 2010, Potemski et al. 2006, Milde-Langosch et al. 2013, Kalfusova et al. 2016, Mahjabeen et al. 2012, Yuan et al. 2016). Für die TOP2A gibt es etwa genauso viele Studien, welche in verschiedenen Tumoren ihre Expression auf der

Protein- oder der mRNA-Ebene analysierten. Vergleiche zwischen beiden Methodiken gibt es bisher aber nur wenige. Diese zeigen ebenso wie die vorliegende Arbeit eine gute Konkordanz zwischen Protein und der mRNA (Meng et al. 2012, Xu et al. 2015). Auch in Bezug auf die RacGAP1-Expression wurde in den meisten Veröffentlichungen entweder nur eine Immunhistochemie oder eine PCR durchgeführt. Die Arbeitsgruppen von Liang et al. (2013) und Imaoka et al. (2015) setzten an Tumorproben zwar beide Methoden ein, verglichen die Ergebnisse aber nicht miteinander. In gastrischen Tumoren konnten Saigusa et al. (2015) keine Korrelation zwischen der IHC und der qRT-PCR für das RacGAP1 feststellen. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit wurden für die immunhistochemische Evaluierung jedoch gute Korrelationen mit den entsprechenden klinischen Daten erhalten. Auch wenn die Daten des **Manuskriptes III** eindeutig eine hohe Konkordanz zwischen IHC-Bestimmung und qRT-PCR der RacGAP-Expression zeigen, bestehen gerade in den SCLC auch Expressionsunterschiede zwischen der Protein- und der mRNA-Ebene. Es gibt bereits Hinweise dafür, dass diese Unterschiede bei dem RacGAP1 durch eine miRNA-Regulation bedingt sind (Greco et al. 2011, Ramalingam et al. 2015). Diskrepanzen könnten aber auch auf die verwendeten Antikörper in den immunhistochemischen Untersuchungen zurückzuführen sein, da sich diese in allen bisherigen Arbeiten voneinander unterscheiden. Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden im Vorfeld viele RacGAP1-Antikörper getestet, wobei der polyklonale Anti-RacGAP1-Antikörper HPA043912 von Atlas Antibodies mit Abstand die besten Färbungen lieferte.

### 6.3.7 Klinische Anwendbarkeit von Ki-67, TOP2A und RacGAP1

Obwohl das Ki-67 schon sehr lange als Marker zur Darstellung der aktiv proliferierenden Fraktion eines Tumors in der Tumordiagnostik und auch im Grading von GEP-NEN etabliert ist, bestehen noch viele Diskussionpunkte zum Einsatz in BP-NEN. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann jedoch geschlossen werden, dass es in den pulmonalen neuroendokrinen Tumoren ebenfalls für die Abgrenzung der Entitäten und das Grading angewendet werden kann. Die Methodik der Ki-67-Immunhistochemie ist mittlerweile weltweit standardisiert und es existiert ein valider Antikörper von Dako (Klon MIB-1), welcher für diagnostische Zwecke weltweit genutzt werden kann. Auch wenn oft beschrieben wird, dass die Evaluierung subjektiven Einflüssen unterliegt, hat sich die Variabilität der Ergebnisse zwischen verschiedenen Untersuchern im **Manuskript III** und auch in weiteren Publikationen als nicht gravierend herausgestellt (Mengel et al. 2002, Pelosi et al. 2014a, Swarts et al. 2014, van Velthuysen et al. 2014a). Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und anderer Studien zeigen, ähneln die ermittelten Cut-off-Werte für das Grading der BP-NEN denen der GEP-NEN (Singh et al. 2014, van Velthuysen et al. 2014a). Die Ki-67-IHC-Evaluierung ist im Vergleich zur Mitosenzählung deutlich weniger zeit- und arbeitsintensiv und auch geringer

subjektiv beeinflusst, da gefärbte Nuclei besser definiert werden können als verschiedene Mitosestadien. Doch wie bereits durch die Autoren Liu et al. (2014), Rindi et al. (2014), van Velthuysen et al. (2014b) und Joseph et al. (2015) vermerkt wurde, kann die Ermittlung der Mitoserate nicht ganz ersetzt werden: Das Grading der BP-NEN sollte neben der histologischen Differenzierung in einem dreifach-gestützten System vorwiegend mittels Ki-67-Evaluierung erfolgen und in überlappenden Bereichen zwischen den Entitäten zusätzlich die Mitoserate und das Ausmaß an Nekrose einbezogen werden. In dieser Hinsicht müssen die automatisierte Auswertung der Ki-67-IHC und die qRT-PCR noch weiterhin auf ihre Eignung geprüft und standardisiert werden, um sie schließlich für das Grading verwenden zu können.

Im Vergleich zum Ki-67 hat die TOP2A-Bestimmung den Vorteil, dass sie eine direkte Vorhersage zum Nutzen einer Therapie mit TOP2-Inhibitoren ermöglicht. Durch die starke Korrelation beider Marker und auch durch Erfahrungswerte, wird eine hohe Ki-67-Expression trotzdem mit einer guten Ansprechbarkeit auf zytotoxische Substanzen verbunden und kann auch als Surrogatparameter dafür verwendet werden (Singh et al. 2014, Wu et al. 2014a, Basu et al. 2015). Bei der TOP2A ist die IHC-Evaluierung ebenfalls etabliert. Wie für das Ki-67 sind hier gute Antikörper kommerziell erhältlich, da die TOP2A bereits in der Mammakarzinom-Diagnostik Verwendung findet. Bei NEN ist die Analyse dieses Enzyms dagegen noch nicht eingeführt, aber auch hier stellt sich die Frage nach der Subjektivität der IHC-Bewertung, der Wertigkeit einer automatisierten Auswertung sowie nach optimalen Cut-off-Werten.

Ein neuer Marker, der bereits in vorherigen Veröffentlichungen sein großes Potential zeigen konnte, bei den verschiedensten Malignitäten die Prognose der Patienten vorherzusagen, ist das RacGAP1 (Ke et al. 2013, Milde-Langosch et al. 2013, Pliarchopoulou et al. 2013, Imaoka et al. 2015, Saigusa et al. 2015). So zeigte es auch in der vorliegenden Untersuchung im Vergleich zu den beiden anderen Markern eine noch bessere prognostische Aussagekraft, vor allem auf Proteinebene und in SCLC-Patienten. Neben der Beteiligung an der Zytokinese hat das RacGAP1 zahlreiche weitere Funktionen in der Tumorprogression. Eine Überexpression gibt somit Hinweise auf das biologische Verhalten dieser Tumorgruppe und Anlass, weitere Grundlagenforschung über diesen Marker zu betreiben. Für seinen festen diagnostischen Einsatz wird allerdings zunächst ein guter monoklonaler Antikörper benötigt. Die qRT-PCR eignet sich zwar auch zur RacGAP1-Detektion, jedoch scheint die Proteinebene bei diesem Marker aussagekräftiger zu sein.

Trotz einiger Vor- und Nachteile eignen sich alle drei Marker für die Diagnostik von BP-NEN. Nach dem aktuellen Stand ist die Verwendung des Ki-67 aufgrund der hierfür bereits vorliegenden umfassenden Studienlage am naheliegendsten.

## 7 Schlussfolgerungen

Zur Charakterisierung der BP-NEN wurden in der vorliegenden Arbeit FFPE-Tumorproben eines großen Kollektives aller Entitäten mittels Immunhistochemie und qRT-PCR auf Marker mit klinischer Relevanz untersucht. Dabei war zunächst die Analyse der fünf SSTR-Subtypen interessant, da diese bereits fest in die Diagnostik und auch Therapie der GEP-NEN integriert sind. Um die molekulare Grundlage für deren Einsatz in BP-NEN zu legen, wurde das **Manuskript I** erstellt. Hierbei zeigten sich der SSTR1, der SSTR2A und der SSTR5 mit einer jeweiligen Prävalenz von ~50% als die am häufigsten exprimierten Subtypen, wodurch bewiesen werden konnte, dass auch BP-NEN-Patienten von einer SSTR-basierten Diagnostik und Therapie profitieren können. Als Beispiel einer individualisierten Medizin ist dabei routinepathologisch (IHC und qRT-PCR gleichermaßen geeignet) eine frühzeitige Patienten-Selektion in Bezug auf die Auswahl des entsprechenden SSA erforderlich: Im Falle einer SSTR2A-Expression sollten aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofils die herkömmlichen SSA gewählt werden. Die übrigen SSTR-positiven Patienten können mit Pan-SSA erreicht werden. Diese Analoga binden mit hoher Affinität zusätzlich die anderen in BP-NEN häufig exprimierten SSTR-Subtypen. Somit unterscheiden sich die BP-NEN von den GEP-NEN, indem letztere mit einer SSTR2A-Expression in ~80% der Fälle primär mit herkömmlichen SSA behandelt werden.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass nicht nur die gut-differenzierten TC und AC, sondern auch die SCLC gleichermaßen den SSTR2A exprimieren. Dass schließlich auch diese Patienten von den vergleichsweise besser verträglichen SSTR-basierten Interventionen profitieren können, wurde 2016 mit Verweis auf das **Manuskript I** durch die Arbeitsgruppe von Lapa et al. bestätigt: SSTR2A-exprimierende Tumore von Patienten mit fortgeschrittenen, metastasierten SCLC konnten mit einer SSTR-geführten PET/CT detektiert und im Falle einer starken Expression durch eine PRRT in einen günstigeren Krankheitsverlauf überführt werden (Lapa et al. 2016).

Eine Besonderheit stellte sich auch für den SSTR1 heraus: Seine hohe Expressionsrate in TC und AC (~80%) und das Ausbleiben der Expression in SCLC macht ihn zu einem zusätzlichen diagnostischen Tool zur Abgrenzung der AC von den SCLC. Hohe Werte sprechen folglich auch für ein besseres Überleben der Patienten. Somit ergab sich bei den BP-NEN neben dem diagnostischen und therapeutischen Wert der SSTR auch eine prognostische Aussagekraft.

Aufgrund der Einführung neuer SSA mit unterschiedlichen SSTR-Bindungsspektren gewinnt die Erfassung des SSTR-Subtypen-Status zunehmend an Bedeutung. Zur Standardisierung der immunhistochemischen SSTR-Evaluierung wurden im **Manuskript II** der vorliegenden Untersuchung drei bewährte Scoring-Systeme miteinander verglichen. Dabei erwies sich, trotz guter Korrelationen zwischen allen Scores, der IRS-Score als am besten geeignet. Er bezieht

im Vergleich zum HER2/neu-Score neben den vier Abstufungen der Färbeintensität die prozentualen Anteile der gefärbten Tumorareale mit ein und bleibt dabei, im Gegensatz zum H-Score, trotzdem praktikabel im Handling.

Derzeitig wird auch für das Grading und die Klassifikation der BP-NEN nach neuen Optimierungswegen gesucht. Obwohl das Ki-67 dafür bei den GEP-NEN bereits 2010 in deren WHO-Klassifikation aufgenommen wurde, wird seine Verwendung in BP-NEN aufgrund vieler offener Fragen momentan noch kontrovers diskutiert. Auf diese Problematik sollte schließlich im **Manuskript III** eingegangen werden. Dabei zeigte sich hinsichtlich der Frage nach der optimalen Auswertungsmethodik des Ki-67-Antigens, dass die manuell-visuelle Bewertung der IHC aktuell am besten geeignet ist. Zur Standardisierung dieser wird die Evaluierung des Ki-67-LI in den Hotspot-Arealen von insgesamt 2000 Zellen (400-fache Vergrößerung) empfohlen. Als weitere vielversprechende Methodik stellte sich auch die qRT-PCR zur Ermittlung der Ki-67-mRNA heraus. Diese muss zur Definition valider Cut-off-Werte jedoch in weiteren Studien noch überprüft werden.

Aus der vorliegenden Untersuchung ergab sich, dass die Ki-67-Expressionslevel mit Verlust des Differenzierungsgrades zwischen den Entitäten eindeutig ansteigen, so dass das Ki-67 für das Grading und die Klassifikation der BP-NEN eingesetzt werden kann. Die dabei ermittelten Grenzwerte der manuell-visuellen IHC-Evaluierung sind mit denen der GEP-NEN in NET G1 (< 2%), G2 (2-10%) und NEC G3 (> 20%) vergleichbar. Schließlich ist das Auszählen von gefärbten Zellkernen einfacher und weniger fehlerbehaftet als die Zählung der Mitoserate. In grenzwertigen Fällen sollte aber ein dreifach-gestütztes Gradingssystem angewendet werden, welches neben dem histologischen Bild des Tumors auch den Ki-67-LI, die Auszählung der Mitoserate und die Ermittlung des Ausmaßes an Nekrosen einbezieht.

Ob sich eventuell andere Proliferationsmarker für das Grading und die Klassifikation der BP-NEN besser eignen, sollte im **Manuskript III** zusätzlich geprüft werden. Die TOP2A lieferte dabei ähnliche Ergebnisse wie das Ki-67, birgt aber den Vorteil, dass sie eine direkte prädiktive Aussage hinsichtlich einer TOP2-abzielenden Therapie gibt. Als ein neuer, vielversprechender Marker stellte sich das RacGAP1 heraus. Es zeigte besonders bei SCLC-Patienten auf Proteinebene eine noch bessere prognostische Aussagekraft als die anderen beiden Proliferationsmarker und ist dabei in viele Tumor-promovierende Aufgaben involviert. So könnte eine Aufklärung seiner Rolle in der Tumorbilogie zu neuen therapeutischen Ansätzen führen. Auch wenn die vorliegende Arbeit zusammenfassend einen Fortschritt hinsichtlich einer verbesserten Diagnostik und einer daraus resultierenden Therapie in BP-NEN ermöglicht, sollte die Suche nach neuen Zielstrukturen weitergehen, um letztlich auch Patienten mit LCNEC und vor allem SCLC neue Therapieoptionen mit besseren Prognosen in Aussicht zu stellen.



## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Al-Khafaji B, Noffsinger AE, Miller MA, DeVoe G, Stemmermann GN, Fenoglio-Preiser C. 1998. Immunohistologic analysis of gastrointestinal and pulmonary carcinoid tumors. *Hum Pathol*, 29 (9):992-999.
- Al-Mulla F. 2011. Formalin-fixed paraffin-embedded tissues methods and protocols New York: Humana Press,.
- Anderson C, Ludwig ME, O'Donnell M, Garcia N. 1990. Fine needle aspiration cytology of pulmonary carcinoid tumors. *Acta Cytol*, 34 (4):505-510.
- Arbiser ZK, Arbiser JL, Cohen C, Gal AA. 2001. Neuroendocrine lung tumors: grade correlates with proliferation but not angiogenesis. *Mod Pathol*, 14 (12):1195-1199.
- Arrigoni MG, Woolner LB, Bernatz PE. 1972. Atypical carcinoid tumors of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 64 (3):413-421.
- Aslan DL, Gulbahce HE, Pambuccian SE, Manivel JC, Jessurun J. 2005. Ki-67 immunoreactivity in the differential diagnosis of pulmonary neuroendocrine neoplasms in specimens with extensive crush artifact. *Am J Clin Pathol*, 123 (6):874-878.
- Austin CA, Marsh KL. 1998. Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *Bioessays*, 20 (3):215-226.
- Azzarelli R, Kerloch T, Pacary E. 2014. Regulation of cerebral cortex development by Rho GTPases: insights from in vivo studies. *Front Cell Neurosci*, 8:445.
- Bastos RN, Penate X, Bates M, Hammond D, Barr FA. 2012. CYK4 inhibits Rac1-dependent PAK1 and ARHGEF7 effector pathways during cytokinesis. *J Cell Biol*, 198 (5):865-880.
- Basu S, Ranade R, Thapa P. 2015. Correlation and discordance of tumour proliferation index and molecular imaging characteristics and their implications for treatment decisions and outcome pertaining to peptide receptor radionuclide therapy in patients with advanced neuroendocrine tumour: developing a personalized model. *Nucl Med Commun*, 36 (8):766-774.
- Bau JT, Kurz EU. 2014. Structural determinants of the catalytic inhibition of human topoisomerase IIalpha by salicylate analogs and salicylate-based drugs. *Biochem Pharmacol*, 89 (4):464-476.
- Baum RP, Kulkarni HR. 2012. THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labeled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience. *Theranostics*, 2 (5):437-447.
- Baum RP, Kulkarni HR, Carreras C. 2012. Peptides and receptors in image-guided therapy: theranostics for neuroendocrine neoplasms. *Semin Nucl Med*, 42 (3):190-207.
- Beasley MB. 2008. Pulmonary neuroendocrine tumours and proliferations: a review and update. *Diagnostic Histopathology*, 14 (10):465-473.

- Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. 2005. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol*, 40 (2):90-97.
- Ben-Shlomo A, Melmed S. 2010. Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol Metab*, 21 (3):123-133.
- Bergsland EK. 2013. The evolving landscape of neuroendocrine tumors. *Semin Oncol*, 40 (1):4-22.
- Bergsma H, van Vliet EI, Teunissen JJ, Kam BL, de Herder WW, Peeters RP, Krenning EP, Kwekkeboom DJ. 2012. Peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) for GEP-NETs. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 26 (6):867-881.
- Bertani E, Fazio N, Botteri E, Chiappa A, Falconi M, Grana C, Bodei L, Papis D, Spada F, Bazolli B, Andreoni B. 2014. Resection of the primary pancreatic neuroendocrine tumor in patients with unresectable liver metastases: possible indications for a multimodal approach. *Surgery*, 155 (4):607-614.
- Bertino EM, Confer PD, Colonna JE, Ross P, Otterson GA. 2009. Pulmonary neuroendocrine/carcinoid tumors: a review article. *Cancer*, 115 (19):4434-4441.
- Binaschi M, Giaccone G, Gazdar AF, De Isabella P, Ricotti GC, Capranico G, Zunino F. 1992. Characterization of a topoisomerase II gene rearrangement in a human small-cell lung cancer cell line. *J Natl Cancer Inst*, 84 (22):1710-1716.
- Booth DG, Takagi M, Sanchez-Pulido L, Petfalski E, Vargiu G, Samejima K, Imamoto N, Ponting CP, Tollervey D, Earnshaw WC, Vagnarelli P. 2014. Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *Elife*, 3:e01641.
- Braga F, Ferraro S, Mozzi R, Dolci A, Panteghini M. 2013. Biological variation of neuroendocrine tumor markers chromogranin A and neuron-specific enolase. *Clin Biochem*, 46 (1-2):148-151.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 179 (4068):77-79.
- Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. 2010. A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase IIalpha, and TPX2): an immunohistochemical correlation, testing, and optimizing for mantle cell lymphoma. *Virchows Arch*, 456 (6):671-679.
- Bruchhausen Fv, Hager HHJ. 2000. *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*. Elektronische Ressource Aufl. Berlin u.a.: Springer.
- Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. 1992. Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (23):11151-11155.
- Burden DA, Osheroff N. 1998. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1400 (1-3):139-154.

- Burkard ME, Maciejowski J, Rodriguez-Bravo V, Repka M, Lowery DM, Clauser KR, Zhang C, Shokat KM, Carr SA, Yaffe MB, Jallepalli PV. 2009. Plk1 self-organization and priming phosphorylation of HsCYK-4 at the spindle midzone regulate the onset of division in human cells. *PLoS Biol*, 7 (5):e1000111.
- Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Orta ML, Pastor N, Austin CA, Mateos S, Lopez-Lazaro M. 2013. Alpha, beta-unsaturated lactones 2-furanone and 2-pyrone induce cellular DNA damage, formation of topoisomerase I- and II-DNA complexes and cancer cell death. *Toxicol Lett*, 222 (1):64-71.
- Campana D, Capurso G, Partelli S, Nori F, Panzuto F, Tamburrino D, Cacciari G, Delle Fave G, Falconi M, Tomassetti P. 2013. Radiolabelled somatostatin analogue treatment in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: factors associated with response and suggestions for therapeutic sequence. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 40 (8):1197-1205.
- Campling B, Baer K, Gerlach J, Lam Y, Cole S, Mirski S. 1997. Topoisomerase II levels and drug response in small cell lung cancer. *Int J Oncol*, 10 (5):885-893.
- Campos M, Campos DE, Ribeiro GG, Eguchi FC, Silva SR, Oliveira DE, Costa DA, Curcelli EC, Nunes MC, Penna V, Longatto-Filho A. 2013. Ki-67 and CD100 immunohistochemical expression is associated with local recurrence and poor prognosis in soft tissue sarcomas, respectively. *Oncol Lett*, 5 (5):1527-1535.
- Caplin ME, Baudin E, Ferolla P, Filosso P, Garcia-Yuste M, Lim E, Oberg K, Pelosi G, Perren A, Rossi RE, Travis WD, participants Ecc. 2015. Pulmonary neuroendocrine (carcinoid) tumors: European Neuroendocrine Tumor Society expert consensus and recommendations for best practice for typical and atypical pulmonary carcinoids. *Ann Oncol*.
- Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA, Jr., Varella-Garcia M. 2005. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 97 (9):643-655.
- Casciano R, Wang X, Stern L, Parikh R, Chulikavit M, Willet J, Liu Z, Strosberg J, Cadiot G, Riechelmann R. 2013. International Practice Patterns and Resource Utilization in the Treatment of Neuroendocrine Tumors. *Pancreas*.
- Cerilli LA, Ritter JH, Mills SE, Wick MR. 2001. Neuroendocrine neoplasms of the lung. *Am J Clin Pathol*, 116 Suppl:S65-96.
- Chang YC, Hsiao YM, Wu MF, Ou CC, Lin YW, Lue KH, Ko JL. 2013. Interruption of lung cancer cell migration and proliferation by fungal immunomodulatory protein FIP-fve from *Flammulina velutipes*. *J Agric Food Chem*, 61 (49):12044-12052.
- Chen J, Xia H, Zhang X, Karthik S, Pratap SV, Ooi LL, Hong W, Hui KM. 2015. ECT2 regulates the Rho/ERK signalling axis to promote early recurrence in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 62 (6):1287-1295.

- Cordoba-Chacon J, Gahete MD, Duran-Prado M, Pozo-Salas AI, Malagon MM, Gracia-Navarro F, Kineman RD, Luque RM, Castano JP. 2010. Identification and characterization of new functional truncated variants of somatostatin receptor subtype 5 in rodents. *Cell Mol Life Sci*, 67 (7):1147-1163.
- Costes V, Marty-Ane C, Picot MC, Serre I, Pujol JL, Mary H, Baldet P. 1995. Typical and atypical bronchopulmonary carcinoid tumors: a clinicopathologic and KI-67-labeling study. *Hum Pathol*, 26 (7):740-745.
- Csaba Z, Peineau S, Dournaud P. 2012. Molecular mechanisms of somatostatin receptor trafficking. *J Mol Endocrinol*, 48 (1):R1-12.
- Dalm VA, van Hagen PM, van Koetsveld PM, Achilefu S, Houtsmuller AB, Pols DH, van der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. 2003. Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285 (2):E344-353.
- Davies T, Canman JC. 2012. Stuck in the middle: Rac, adhesion, and cytokinesis. *J Cell Biol*, 198 (5):769-771.
- De Filippis B, Romano E, Laviola G. 2014. Aberrant Rho GTPases signaling and cognitive dysfunction: in vivo evidence for a compelling molecular relationship. *Neurosci Biobehav Rev*, 46 Pt 2:285-301.
- de Herder WW, Kwekkeboom DJ, Feelders RA, van Aken MO, Lamberts SW, van der Lely AJ, Krenning EP. 2006. Somatostatin receptor imaging for neuroendocrine tumors. *Pituitary*, 9 (3):243-248.
- De Martino MC, Hofland LJ, Lamberts SW. 2010. Somatostatin and somatostatin receptors: from basic concepts to clinical applications. *Prog Brain Res*, 182:255-280.
- de Resende MF, Vieira S, Chinen LT, Chiappelli F, da Fonseca FP, Guimaraes GC, Soares FA, Neves I, Pagotty S, Pellionisz PA, Barkhordarian A, Brant X, Rocha RM. 2013. Prognostication of prostate cancer based on TOP2A protein and gene assessment: TOP2A in prostate cancer. *J Transl Med*, 11:36.
- Deng SM, Zhang W, Zhang B, Chen YY, Li JH, Wu YW. 2015. Correlation between the Uptake of 18F-Fluorodeoxyglucose (18F-FDG) and the Expression of Proliferation-Associated Antigen Ki-67 in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 10 (6):e0129028.
- Detterbeck FC. 2010. Management of carcinoid tumors. *Ann Thorac Surg*, 89 (3):998-1005.
- Diakatou E, Kaltsas G, Tzivras M, Kanakis G, Papaliodi E, Kontogeorgos G. 2011. Somatostatin and dopamine receptor profile of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: an immunohistochemical study. *Endocr Pathol*, 22 (1):24-30.
- Dingemans AC, van Ark-Otte J, Span S, Scagliotti GV, van der Valk P, Postmus PE, Giaccone G. 2001. Topoisomerase IIalpha and other drug resistance markers in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 32 (2):117-128.

Dingemans AM, Pinedo HM, Giaccone G. 1998. Clinical resistance to topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta*, 1400 (1-3):275-288.

Dingemans AM, Witlox MA, Stallaert RA, van der Valk P, Postmus PE, Giaccone G. 1999. Expression of DNA topoisomerase IIalpha and topoisomerase IIbeta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 5 (8):2048-2058.

Doenecke D, Karlson P. 2005. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie : Falttafel mit Stoffwechselübersicht*. 15., komplett überarb. und neugestaltete Aufl. Aufl. Stuttgart u.a.: Thieme.

Dresler CM, Ritter JH, Patterson GA, Ross E, Bailey MS, Wick MR. 1997. Clinical-pathologic analysis of 40 patients with large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg*, 63 (1):180-185.

du Manoir S, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Brugal G. 1991. Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry*, 12 (5):455-463.

Duchrow M, Schluter C, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J. 1996. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif*, 29 (1):1-12.

Duran-Prado M, Saveanu A, Luque RM, Gahete MD, Gracia-Navarro F, Jaquet P, Dufour H, Malagon MM, Culler MD, Barlier A, Castano JP. 2010. A potential inhibitory role for the new truncated variant of somatostatin receptor 5, sst5TMD4, in pituitary adenomas poorly responsive to somatostatin analogs. *J Clin Endocrinol Metab*, 95 (5):2497-2502.

Eriksson B, Renstrup J, Imam H, Oberg K. 1997. High-dose treatment with lanreotide of patients with advanced neuroendocrine gastrointestinal tumors: clinical and biological effects. *Ann Oncol*, 8 (10):1041-1044.

Feelders RA, Hofland LJ, Kwekkeboom DJ, Lamberts S, de Herder WW. 2012. Chapter 35 - Neuroendocrine Tumors. In: George F, Donald WP, Jon LevineA2 - George Fink DWP, Jon L, Hrsg. *Handbook of Neuroendocrinology*. San Diego: Academic Press, 761-778.

Felip E, Rojo F, Reck M, Heller A, Klughammer B, Sala G, Cedres S, Peralta S, Maacke H, Foernzler D, Parera M, Mocks J, Saura C, Gatzemeier U, Baselga J. 2008. A phase II pharmacodynamic study of erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 14 (12):3867-3874.

Fink G, Krelbaum T, Yellin A, Bendayan D, Saute M, Glazer M, Kramer MR. 2001. Pulmonary carcinoid: presentation, diagnosis, and outcome in 142 cases in Israel and review of 640 cases from the literature. *Chest*, 119 (6):1647-1651.

Fischer T, Doll C, Jacobs S, Kolodziej A, Stumm R, Schulz S. 2008. Reassessment of sst2 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J Clin Endocrinol Metab*, 93 (11):4519-4524.



- Fountzilias G, Christodoulou C, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Xanthakis I, Batistatou A, Pentheroudakis G, Xiros N, Papaspirou I, Koumarianou A, Papakostas P, Bafaloukos D, Skarlos DV, Kalogeras KT. 2012. Topoisomerase II alpha gene amplification is a favorable prognostic factor in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *J Transl Med*, 10:212.
- Gabriel M, Decristoforo C, Kendler D, Dobrozemsky G, Heute D, Uprimny C, Kovacs P, Von Guggenberg E, Bale R, Virgolini JJ. 2007. 68Ga-DOTA-Tyr3-octreotide PET in neuroendocrine tumors: comparison with somatostatin receptor scintigraphy and CT. *J Nucl Med*, 48 (4):508-518.
- Galvan JA, Gonzalez MV, Crespo G, Folgueras MV, Astudillo A. 2010. Snail nuclear expression parallels higher malignancy potential in neuroendocrine lung tumors. *Lung Cancer*, 69 (3):289-295.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31 (1):13-20.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133 (4):1710-1715.
- Gori S, Sidoni A, Colozza M, Ferri I, Mameli MG, Fenocchio D, Stocchi L, Foglietta J, Ludovini V, Minenza E, De Angelis V, Crino L. 2009. EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Ann Oncol*, 20 (4):648-654.
- Graefe KH, Lutz W, Bönisch H, Hahn J-M. 2011. *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Thieme.
- Granberg D, Wilander E, Oberg K, Skogseid B. 2000. Prognostic markers in patients with typical bronchial carcinoid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 85 (9):3425-3430.
- Gray J, Cubitt CL, Zhang S, Chiappori A. 2012. Combination of HDAC and topoisomerase inhibitors in small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther*, 13 (8):614-622.
- Greco D, Kivi N, Qian K, Leivonen SK, Auvinen P, Auvinen E. 2011. Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS One*, 6 (7):e21646.
- Grimaldi F, Muser D, Beltrami CA, Machin P, Morelli A, Pizzolitto S, Talmassons G, Marciello F, Colao AA, Monaco R, Monaco G, Faggiano A. 2011. Partitioning of bronchopulmonary carcinoids in two different prognostic categories by ki-67 score. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2:20.
- Gustafsson BI, Kidd M, Modlin IM. 2008a. Neuroendocrine tumors of the diffuse neuroendocrine system. *Curr Opin Oncol*, 20 (1):1-12.
- Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malfertheiner MV, Modlin IM. 2008b. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer*, 113 (1):5-21.

- Halperin DM, Dasari A, Yao JC. 2016. [177Lu-DOTA0,Tyr3]-octreotate in the treatment of midgut neuroendocrine tumors. *Future Oncol*, 12 (3):313-321.
- Han Y, Li G, Su C, Ren H, Chu X, Zhao Q, Zhu Y, Wang Z, Hu B, An G, Kang J, Wang W, Yu D, Song X, Xiao N, Li Y, Li X, Yang H, Yu G, Liu Z. 2013. Exploratory study on the correlation between 14 lung cancer-related gene expression and specific clinical characteristics of NSCLC patients. *Mol Clin Oncol*, 1 (5):887-893.
- Hazar-Rethinam M, de Long LM, Gannon OM, Boros S, Vargas AC, Dzienis M, Mukhopadhyay P, Saenz-Ponce N, Dantzie DD, Simpson F, Saunders NA. 2015. RacGAP1 Is a Novel Downstream Effector of E2F7-Dependent Resistance to Doxorubicin and Is Prognostic for Overall Survival in Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther*, 14 (8):1939-1950.
- Heasman SJ, Ridley AJ. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (9):690-701.
- Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R. 1996. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif*, 29 (7):413-425.
- Helpap B, Kollermann J. 2001. Immunohistochemical analysis of the proliferative activity of neuroendocrine tumors from various organs. Are there indications for a neuroendocrine tumor-carcinoma sequence? *Virchows Arch*, 438 (1):86-91.
- Hentic O, Couvelard A, Rebours V, Zappa M, Dokmak S, Hammel P, Maire F, O'Toole D, Levy P, Sauvanet A, Ruszniewski P. 2011. Ki-67 index, tumor differentiation, and extent of liver involvement are independent prognostic factors in patients with liver metastases of digestive endocrine carcinomas. *Endocr Relat Cancer*, 18 (1):51-59.
- Hirsch FR, Dziadziuszko R, Thatcher N, Mann H, Watkins C, Parums DV, Speake G, Holloway B, Bunn PA, Jr., Franklin WA. 2008. Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry: comparison of antibodies and cutoff points to predict benefit from gefitinib in a phase 3 placebo-controlled study in advanced nonsmall-cell lung cancer. *Cancer*, 112 (5):1114-1121.
- Hofland LJ, Liu Q, Van Koetsveld PM, Zuijderwijk J, Van Der Ham F, De Krijger RR, Schonbrunn A, Lamberts SW. 1999. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2A in human somatostatin receptor positive tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (2):775-780.
- Horita N, Yamamoto M, Sato T, Tsukahara T, Nagakura H, Tashiro K, Shibata Y, Watanabe H, Nagai K, Nakashima K, Ushio R, Ikeda M, Kobayashi N, Shinkai M, Kudo M, Kaneko T. 2016. Amrubicin for relapsed small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of 803 patients. *Sci Rep*, 6:18999.
- Hörsch D, Sayeg Y, Bonnet R, Kaemmerer D, Presselt N, Baum RP. 2012. [Expert dialogue: neuroendocrine tumours of the lungs and gastroenteropancreatic system]. *Pneumologie*, 66 (1):44-48.
- Huang H, Liu J, Meng Q, Niu G. 2015. Multidrug resistance protein and topoisomerase 2 alpha expression in non-small cell lung cancer are related with brain metastasis postoperatively. *Int J Clin Exp Pathol*, 8 (9):11537-11542.

- Igarashi T, Jiang SX, Kameya T, Asamura H, Sato Y, Nagai K, Okayasu I. 2004. Divergent cyclin B1 expression and Rb/p16/cyclin D1 pathway aberrations among pulmonary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol*, 17 (10):1259-1267.
- Imaoka H, Toiyama Y, Saigusa S, Kawamura M, Kawamoto A, Okugawa Y, Hiro J, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M. 2015. RacGAP1 expression, increasing tumor malignant potential, as a predictive biomarker for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 36 (3):346-354.
- Iyoda A, Hiroshima K, Moriya Y, Mizobuchi T, Otsuji M, Sekine Y, Shibuya K, Iizasa T, Saitoh Y, Fujisawa T. 2004. Pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma demonstrates high proliferative activity. *Ann Thorac Surg*, 77 (6):1891-1895; discussion 1895.
- Jacobs MA, Weinstein S, Hope TA, Aslam R, Yee J, Coakley F. 2014. Neuroendocrine tumors: beyond the abdomen. *J Comput Assist Tomogr*, 38 (6):898-914.
- Jacquemet G, Green DM, Bridgewater RE, von Kriegsheim A, Humphries MJ, Norman JC, Caswell PT. 2013. RCP-driven alpha5beta1 recycling suppresses Rac and promotes RhoA activity via the RacGAP1-IQGAP1 complex. *J Cell Biol*, 202 (6):917-935.
- Janson ET, Stridsberg M, Gobl A, Westlin JE, Oberg K. 1998. Determination of somatostatin receptor subtype 2 in carcinoid tumors by immunohistochemical investigation with somatostatin receptor subtype 2 antibodies. *Cancer Res*, 58 (11):2375-2378.
- Jarvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Barlund M, Borg A, Grenman S, Isola J. 2000. Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol*, 156 (3):839-847.
- Jeung MY, Gasser B, Gangi A, Charneau D, Ducroq X, Kessler R, Quoix E, Roy C. 2002. Bronchial carcinoid tumors of the thorax: spectrum of radiologic findings. *Radiographics*, 22 (2):351-365.
- Joseph MG, Shibani A, Panjwani N, Arab A, Shepherd J, Stitt LW, Inculet R. 2015. Usefulness of Ki-67, Mitoses, and Tumor Size for Predicting Metastasis in Carcinoid Tumors of the Lung: A Study of 48 Cases at a Tertiary Care Centre in Canada. *Lung Cancer Int*, 2015:545601.
- Kaemmerer D, Khatib-Chahidi K, Paul Baum R, Horsch D, Presselt N, Sanger J, Kunze A, Hommann M. 2011. Concomitant lung and gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and the value of gallium-68 PET/CT. *Cancer Imaging*, 11:179-183.
- Kaemmerer D, Peter L, Lupp A, Schulz S, Sanger J, Baum RP, Prasad V, Hommann M. 2012. Comparing of IRS and Her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol*, 5 (3):187-194.
- Kalfusova A, Krskova IH, Kalinova M, Linke Z, Kodet R. 2016. Gastrointestinal stromal tumors - quantitative detection of the Ki-67, TPX2, TOP2A, and hTERT telomerase subunit mRNA levels to determine a proliferation activity and a potential for aggressive biological behavior. *Neoplasma*.

- Kanakakis G, Grimelius L, Spathis A, Tringidou R, Rassidakis GZ, Oberg K, Kaltsas G, Tsolakis AV. 2015. Expression of Somatostatin Receptors 1-5 and Dopamine Receptor 2 in Lung Carcinoids: Implications for a Therapeutic Role. *Neuroendocrinology*, 101 (3):211-222.
- Kaplan B, Stevens CW, Allen P, Liao ZX, Komaki R. 2003. Outcomes and patterns of failure in bronchial carcinoid tumors. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 55 (1):125-131.
- Ke HL, Ke RH, Li ST, Li B, Lu HT, Wang XQ. 2013. Expression of RACGAP1 in high grade meningiomas: a potential role in cancer progression. *J Neurooncol*, 113 (2):327-332.
- Kill IR. 1996. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci*, 109 ( Pt 6):1253-1263.
- Kimura N, Pilichowska M, Date F, Kimura I, Schindler M. 1999. Immunohistochemical expression of somatostatin type 2A receptor in neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res*, 5 (11):3483-3487.
- Kitamura T, Kawashima T, Minoshima Y, Tonoizuka Y, Hirose K, Nosaka T. 2001. Role of MgcRacGAP/Cyk4 as a regulator of the small GTPase Rho family in cytokinesis and cell differentiation. *Cell Struct Funct*, 26 (6):645-651.
- Kleine B, Rossmanith WG. 2010. *Hormone und Hormonsystem : Lehrbuch der Endokrinologie*. 2., erweiterte Auflage Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Klimstra DS. 2013. Pathology reporting of neuroendocrine tumors: essential elements for accurate diagnosis, classification, and staging. *Semin Oncol*, 40 (1):23-36.
- Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S. 2010. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas*, 39 (6):707-712.
- Klöppel G. 2007. Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 21 (1):15-31.
- Kokkola T, Kruse C, Roy-Pogodzik EM, Pekkinen J, Bauch C, Honck HH, Hennemann H, Kreienkamp HJ. 2011. Somatostatin receptor 5 is palmitoylated by the interacting ZDHHC5 palmitoyltransferase. *FEBS Lett*, 585 (17):2665-2670.
- Kowalski J, Henze M, Schuhmacher J, Macke HR, Hofmann M, Haberkorn U. 2003. Evaluation of positron emission tomography imaging using [68Ga]-DOTA-D Phe(1)-Tyr(3)-Octreotide in comparison to [111In]-DTPAOC SPECT. First results in patients with neuroendocrine tumors. *Mol Imaging Biol*, 5 (1):42-48.
- Kruger S, Buck AK, Blumstein NM, Pauls S, Schelzig H, Kropf C, Schumann C, Mottaghy FM, Hombach V, Reske SN. 2006. Use of integrated FDG PET/CT imaging in pulmonary carcinoid tumours. *J Intern Med*, 260 (6):545-550.
- Kubota K, Hida T, Ishikura S, Mizusawa J, Nishio M, Kawahara M, Yokoyama A, Imamura F, Takeda K, Negoro S, Harada M, Okamoto H, Yamamoto N, Shinkai T, Sakai H, Matsui K,

- Nakagawa K, Shibata T, Saijo N, Tamura T, Japan Clinical Oncology G. 2014. Etoposide and cisplatin versus irinotecan and cisplatin in patients with limited-stage small-cell lung cancer treated with etoposide and cisplatin plus concurrent accelerated hyperfractionated thoracic radiotherapy (JCOG0202): a randomised phase 3 study. *Lancet Oncol*, 15 (1):106-113.
- Kulaksiz H, Eissele R, Rossler D, Schulz S, Holtt V, Cetin Y, Arnold R. 2002. Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. *Gut*, 50 (1):52-60.
- Kwekkeboom DJ, Krenning EP. 2002. Somatostatin receptor imaging. *Semin Nucl Med*, 32 (2):84-91.
- Laitinen KL, Soini Y, Mattila J, Paakko P. 2000. Atypical bronchopulmonary carcinoids show a tendency toward increased apoptotic and proliferative activity. *Cancer*, 88 (7):1590-1598.
- Lan J, Huang HY, Lee SW, Chen TJ, Tai HC, Hsu HP, Chang KY, Li CF. 2014. TOP2A overexpression as a poor prognostic factor in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol*, 35 (1):179-187.
- Lang AJ, Mirski SE, Cummings HJ, Yu Q, Gerlach JH, Cole SP. 1998. Structural organization of the human TOP2A and TOP2B genes. *Gene*, 221 (2):255-266.
- Lapa C, Hanscheid H, Wild V, Pelzer T, Schirbel A, Werner RA, Droll S, Herrmann K, Buck AK, Luckertath K. 2016. Somatostatin receptor expression in small cell lung cancer as a prognostic marker and a target for peptide receptor radionuclide therapy. *Oncotarget*.
- Laurent F, Montaudon M, Corneloup O. 2006. CT and MRI of Lung Cancer. *Respiration*, 73 (2):133-142.
- Lee HJ, Xu X, Choe G, Chung DH, Seo JW, Lee JH, Lee CT, Jheon S, Sung SW, Chung JH. 2010. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas: Comparison of four commercially available antibodies by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization study. *Lung Cancer*, 68 (3):375-382.
- Li F, Ye B, Hong L, Xu H, Fishbein MC. 2011. Epigenetic modifications of histone h4 in lung neuroendocrine tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 19 (5):389-394.
- Li J, Wang J, Jiao H, Liao J, Xu X. 2010. Cytokinesis and cancer: Polo loves ROCK'n' Rho(A). *J Genet Genomics*, 37 (3):159-172.
- Liang Y, Liu M, Wang P, Ding X, Cao Y. 2013. Analysis of 20 genes at chromosome band 12q13: RACGAP1 and MCRS1 overexpression in nonsmall-cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 52 (3):305-315.
- Lin O, Olgac S, Green I, Zakowski MF, Klimstra DS. 2003. Immunohistochemical staining of cytologic smears with MIB-1 helps distinguish low-grade from high-grade neuroendocrine neoplasms. *Am J Clin Pathol*, 120 (2):209-216.



- Liu SZ, Staats PN, Goicochea L, Alexiev BA, Shah N, Dixon R, Burke AP. 2014. Automated quantification of Ki-67 proliferative index of excised neuroendocrine tumors of the lung. *Diagn Pathol*, 9:174.
- Lupp A, Nagel F, Schulz S. 2013. Reevaluation of sst somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-7. *Regul Pept*, 183C:1-6.
- Lupp A, Hunder A, Petrich A, Nagel F, Doll C, Schulz S. 2011. Reassessment of sst(5) somatostatin receptor expression in normal and neoplastic human tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-4. *Neuroendocrinology*, 94 (3):255-264.
- Lupp A, Nagel F, Doll C, Rocken C, Evert M, Mawrin C, Saeger W, Schulz S. 2012. Reassessment of sst3 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-5. *Neuroendocrinology*, 96 (4):301-310.
- Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, Payette T, Pistone M, Stecker K, Zhang BM, Zhou YX, Varnholt H, Smith B, Gadd M, Chatfield E, Kessler J, Baer TM, Erlander MG, Sgroi DC. 2003. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (10):5974-5979.
- MacCallum DE, Hall PA. 2000. The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol*, 190 (5):537-544.
- Mahjabeen I, Chen Z, Zhou X, Kayani MA. 2012. Decreased mRNA expression levels of base excision repair (BER) pathway genes is associated with enhanced Ki-67 expression in HNSCC. *Med Oncol*, 29 (5):3620-3625.
- Martin-Perez E, Capdevila J, Castellano D, Jimenez-Fonseca P, Salazar R, Beguiristain-Gomez A, Alonso-Orduna V, Martinez Del Prado P, Villabona-Artero C, Diaz-Perez JA, Monleon A, Marazuela M, Pachon V, Sastre-Valera J, Sevilla I, Castano A, Garcia-Carbonero R. 2013. Prognostic factors and long-term outcome of pancreatic neuroendocrine neoplasms: Ki-67 index shows a greater impact on survival than disease stage. The large experience of the Spanish National Tumor Registry (RGETNE). *Neuroendocrinology*, 98 (2):156-168.
- Maschmeyer G, Mugge LO, Kampfe D, Kreibich U, Wilhelm S, Assmann M, Schwarz M, Kahl C, Kohler S, Grobe N, Niederwieser D. 2015. A retrospective review of diagnosis and treatment modalities of neuroendocrine tumors (excluding primary lung cancer) in 10 oncological institutions of the East German Study Group of Hematology and Oncology (OSHO), 2010-2012. *J Cancer Res Clin Oncol*.
- Meng H, Chen R, Li W, Xu L, Xu L. 2012. Correlations of TOP2A gene aberrations and expression of topoisomerase IIalpha protein and TOP2A mRNA expression in primary breast cancer: a retrospective study of 86 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Pathol Int*, 62 (6):391-399.
- Mengel M, von Wasielewski R, Wiese B, Rudiger T, Muller-Hermelink HK, Kreipe H. 2002. Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol*, 198 (3):292-299.

- Meyerhof W, Wulfsen I, Schonrock C, Fehr S, Richter D. 1992. Molecular cloning of a somatostatin-28 receptor and comparison of its expression pattern with that of a somatostatin-14 receptor in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (21):10267-10271.
- Milde-Langosch K, Karn T, Muller V, Witzel I, Rody A, Schmidt M, Wirtz RM. 2013. Validity of the proliferation markers Ki67, TOP2A, and RacGAP1 in molecular subgroups of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 137 (1):57-67.
- Miller HC, Drymoussis P, Flora R, Goldin R, Spalding D, Frilling A. 2014. Role of Ki-67 Proliferation Index in the Assessment of Patients with Neuroendocrine Neoplasias Regarding the Stage of Disease. *World J Surg*.
- Mizutani G, Nakanishi Y, Watanabe N, Honma T, Obana Y, Seki T, Ohni S, Nemoto N. 2012. Expression of Somatostatin Receptor (SSTR) Subtypes (SSTR-1, 2A, 3, 4 and 5) in Neuroendocrine Tumors Using Real-time RT-PCR Method and Immunohistochemistry. *Acta Histochem Cytochem*, 45 (3):167-176.
- Modlin IM, Lye KD, Kidd M. 2003. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer*, 97 (4):934-959.
- Morandi U, Casali C, Rossi G. 2006. Bronchial typical carcinoid tumors. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 18 (3):191-198.
- Mrklic I, Spagnoli GC, Juretic A, Pogorelic Z, Tomic S. 2014. Co-expression of cancer testis antigens and topoisomerase 2-alpha in triple negative breast carcinomas. *Acta Histochem*, 116 (5):740-746.
- Narumiya S, Yasuda S. 2006. Rho GTPases in animal cell mitosis. *Curr Opin Cell Biol*, 18 (2):199-205.
- Naylor SL, Sakaguchi AY, Shen LP, Bell GI, Rutter WJ, Shows TB. 1983. Polymorphic human somatostatin gene is located on chromosome 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (9):2686-2689.
- O'Brien RN, Shen Z, Tachikawa K, Lee PA, Briggs SP. 2010. Quantitative proteome analysis of pluripotent cells by iTRAQ mass tagging reveals post-transcriptional regulation of proteins required for ES cell self-renewal. *Mol Cell Proteomics*, 9 (10):2238-2251.
- O'Carroll AM, Lolait SJ, Konig M, Mahan LC. 1992. Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol Pharmacol*, 42 (6):939-946.
- Oberg K, Hellman P, Ferolla P, Papotti M, Group EGW. 2012. Neuroendocrine bronchial and thymic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 23 Suppl 7:vii120-123.
- Offermanns S. 2004. *Encyclopedic reference of molecular pharmacology : with 136 tables*. Berlin u.a.: Springer.
- Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. 2004. Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem*, 89 (5):1057-1091.

Osheroff N. 1998. DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta*, 1400 (1-3):1-2.

Pape UF, Jann H, Muller-Nordhorn J, Bockelbrink A, Berndt U, Willich SN, Koch M, Rocken C, Rindi G, Wiedenmann B. 2008. Prognostic relevance of a novel TNM classification system for upper gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer*, 113 (2):256-265.

Papotti M, Croce S, Macri L, Funaro A, Pecchioni C, Schindler M, Bussolati G. 2000. Correlative immunohistochemical and reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of somatostatin receptor type 2 in neuroendocrine tumors of the lung. *Diagn Mol Pathol*, 9 (1):47-57.

Papotti M, Croce S, Bello M, Bongiovanni M, Allia E, Schindler M, Bussolati G. 2001. Expression of somatostatin receptor types 2, 3 and 5 in biopsies and surgical specimens of human lung tumours. Correlation with preoperative octreotide scintigraphy. *Virchows Arch*, 439 (6):787-797.

Papotti M, Bongiovanni M, Volante M, Allia E, Landolfi S, Helboe L, Schindler M, Cole SL, Bussolati G. 2002. Expression of somatostatin receptor types 1-5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Virchows Arch*, 440 (5):461-475.

Parker AS, Eckel-Passow JE, Serie D, Hilton T, Parasramka M, Joseph RW, Wu KJ, Cheville JC, Leibovich BC. 2014. Higher expression of topoisomerase II alpha is an independent marker of increased risk of cancer-specific death in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 66 (5):929-935.

Patel YC. 1999. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*, 20 (3):157-198.

Patel YC, Reichlin S. 1978. Somatostatin in hypothalamus, extrahypothalamic brain, and peripheral tissues of the rat. *Endocrinology*, 102 (2):523-530.

Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB. 1995. The somatostatin receptor family. *Life Sci*, 57 (13):1249-1265.

Pavel M, Kidd M, Modlin I. 2013. Systemic therapeutic options for carcinoid. *Semin Oncol*, 40 (1):84-99.

Pawlikowski M, Melen-Mucha G. 2004. Somatostatin analogs - from new molecules to new applications. *Curr Opin Pharmacol*, 4 (6):608-613.

Pelosi G, Rodriguez J, Viale G, Rosai J. 2005. Typical and atypical pulmonary carcinoid tumor overdiagnosed as small-cell carcinoma on biopsy specimens: a major pitfall in the management of lung cancer patients. *Am J Surg Pathol*, 29 (2):179-187.

Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. 2014a. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol*, 9 (3):273-284.

Pelosi G, Papotti M, Rindi G, Scarpa A. 2014b. Unraveling Tumor Grading and Genomic Landscape in Lung Neuroendocrine Tumors. *Endocr Pathol*.

- Pelosi G, Volante M, Papotti M, Sonzogni A, Masullo M, Viale G. 2006. Peptide receptors in neuroendocrine tumors of the lung as potential tools for radionuclide diagnosis and therapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 50 (4):272-287.
- Pelosi G, Barbareschi M, Cavazza A, Graziano P, Rossi G, Papotti M. 2015. Large cell carcinoma of the lung: a tumor in search of an author. A clinically oriented critical reappraisal. *Lung Cancer*, 87 (3):226-231.
- Pelosi G, Pasini F, Fraggetta F, Pastorino U, Iannucci A, Maisonneuve P, Arrigoni G, De Manzoni G, Bresola E, Viale G. 2003. Independent value of fascin immunoreactivity for predicting lymph node metastases in typical and atypical pulmonary carcinoids. *Lung Cancer*, 42 (2):203-213.
- Petronczki M, Glotzer M, Kraut N, Peters JM. 2007. Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Dev Cell*, 12 (5):713-725.
- Phan AT, Oberg K, Choi J, Harrison LH, Jr., Hassan MM, Strosberg JR, Krenning EP, Kocha W, Woltering EA, Maples WJ, North American Neuroendocrine Tumor S. 2010. NANETS consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: well-differentiated neuroendocrine tumors of the thorax (includes lung and thymus). *Pancreas*, 39 (6):784-798.
- Pliarchopoulou K, Kalogeras KT, Kronenwett R, Wirtz RM, Eleftheraki AG, Batistatou A, Bobos M, Soupos N, Polychronidou G, Gogas H, Samantas E, Christodoulou C, Makatsoris T, Pavlidis N, Pectasides D, Fountzilas G. 2013. Prognostic significance of RACGAP1 mRNA expression in high-risk early breast cancer: a study in primary tumors of breast cancer patients participating in a randomized Hellenic Cooperative Oncology Group trial. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71 (1):245-255.
- Plöckinger U, Wiedenmann B. 2007. Treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Arch*, 451 Suppl 1:S71-80.
- Potemski P, Pluciennik E, Bednarek AK, Kusinska R, Kubiak R, Jesionek-Kupnicka D, Watala C, Kordek R. 2006. Ki-67 expression in operable breast cancer: a comparative study of immunostaining and a real-time RT-PCR assay. *Pathol Res Pract*, 202 (7):491-495.
- Pradayrol L, Jornvall H, Mutt V, Ribet A. 1980. N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett*, 109 (1):55-58.
- Ramalingam D, Happel C, Ziegelbauer JM. 2015. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs repress breakpoint cluster region protein expression, enhance Rac1 activity, and increase in vitro angiogenesis. *J Virol*, 89 (8):4249-4261.
- Ratheesh A, Gomez GA, Priya R, Verma S, Kovacs EM, Jiang K, Brown NH, Akhmanova A, Stehbens SJ, Yap AS. 2012. Centralspindlin and alpha-catenin regulate Rho signalling at the epithelial zonula adherens. *Nat Cell Biol*, 14 (8):818-828.
- Reisine T, Bell GI. 1995. Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocr Rev*, 16 (4):427-442.

- Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. 2001. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med*, 28 (7):836-846.
- Reubi JC, Kappeler A, Waser B, Laissue J, Hipkin RW, Schonbrunn A. 1998. Immunohistochemical localization of somatostatin receptors sst2A in human tumors. *Am J Pathol*, 153 (1):233-245.
- Reubi JC, Laderach U, Waser B, Gebbers JO, Robberecht P, Laissue JA. 2000a. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Res*, 60 (11):3105-3112.
- Reubi JC, Schar JC, Waser B, Wenger S, Heppeler A, Schmitt JS, Macke HR. 2000b. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med*, 27 (3):273-282.
- Ricci S, Antonuzzo A, Galli L, Orlandini C, Ferdeghini M, Boni G, Roncella M, Mosca F, Conte PF. 2000. Long-acting depot lanreotide in the treatment of patients with advanced neuroendocrine tumors. *Am J Clin Oncol*, 23 (4):412-415.
- Richards-Taylor S, Ewings SM, Jaynes E, Tilley C, Ellis SG, Armstrong T, Pearce N, Cave J. 2015. The assessment of Ki-67 as a prognostic marker in neuroendocrine tumours: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol*.
- Righi L, Volante M, Tavaglione V, Bille A, Daniele L, Angusti T, Inzani F, Pelosi G, Rindi G, Papotti M. 2010. Somatostatin receptor tissue distribution in lung neuroendocrine tumours: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 218 'clinically aggressive' cases. *Ann Oncol*, 21 (3):548-555.
- Rijavec M, Silar M, Triller N, Kern I, Cegovnik U, Kosnik M, Korosec P. 2011. Expressions of topoisomerase IIalpha and BCRP in metastatic cells are associated with overall survival in small cell lung cancer patients. *Pathol Oncol Res*, 17 (3):691-696.
- Rindi G, Klersy C, Inzani F, Fellegara G, Ampollini L, Ardizzoni A, Campanini N, Carbognani P, De Pas TM, Galetta D, Granone PL, Righi L, Rusca M, Spaggiari L, Tiseo M, Viale G, Volante M, Papotti M, Pelosi G. 2014. Grading the neuroendocrine tumors of the lung: an evidence-based proposal. *Endocr Relat Cancer*, 21 (1):1-16.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC. 2000. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem*, 275 (11):7862-7869.
- Rosty C, Sheffer M, Tsafrir D, Stransky N, Tsafrir I, Peter M, de Cremoux P, de La Rochefordiere A, Salmon R, Dorval T, Thiery JP, Couturier J, Radvanyi F, Domany E, Sastre-Garau X. 2005. Identification of a proliferation gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma. *Oncogene*, 24 (47):7094-7104.



- Rubin J, Ajani J, Schirmer W, Venook AP, Bukowski R, Pommier R, Saltz L, Dandona P, Anthony L. 1999. Octreotide acetate long-acting formulation versus open-label subcutaneous octreotide acetate in malignant carcinoid syndrome. *J Clin Oncol*, 17 (2):600-606.
- Rugge M, Fassan M, Clemente R, Rizzardi G, Giacomelli L, Pennelli G, Mescoli C, Segat D, Rea F. 2008. Bronchopulmonary carcinoid: phenotype and long-term outcome in a single-institution series of Italian patients. *Clin Cancer Res*, 14 (1):149-154.
- Saigusa S, Tanaka K, Mohri Y, Ohi M, Shimura T, Kitajima T, Kondo S, Okugawa Y, Toiyama Y, Inoue Y, Kusunoki M. 2015. Clinical significance of RacGAP1 expression at the invasive front of gastric cancer. *Gastric Cancer*, 18 (1):84-92.
- Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ. 2008. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell*, 135 (3):510-523.
- Sayeg Y, Sayeg M, Baum RP, Kulkarni HR, Presselt N, Mader I, Kunze A, Sanger J, Horsch D, Bonnet R. 2014. [Pulmonary neuroendocrine neoplasms]. *Pneumologie*, 68 (7):456-477.
- Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. 1993. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*, 123 (3):513-522.
- Schmid HA. 2008. Pasireotide (SOM230): development, mechanism of action and potential applications. *Mol Cell Endocrinol*, 286 (1-2):69-74.
- Schmid HA, Lambertini C, van Vugt HH, Barzaghi-Rinaudo P, Schafer J, Hillenbrand R, Sailer AW, Kaufmann M, Nuciforo P. 2012. Monoclonal antibodies against the human somatostatin receptor subtypes 1-5: development and immunohistochemical application in neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*, 95 (3):232-247.
- Schnabel PA, Junker K. 2015. [Pulmonary neuroendocrine tumors in the new WHO 2015 classification : Start of breaking new grounds?]. *Pathologe*, 36 (3):283-292.
- Schoeffler AJ, Berger JM. 2005. Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochem Soc Trans*, 33 (Pt 6):1465-1470.
- Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182 (3):311-322.
- Sclafani F, Carnaghi C, Di Tommaso L, Rodari M, Destro A, Rimassa L, Giordano L, Chiti A, Roncalli M, Santoro A. 2011. Detection of somatostatin receptor subtypes 2 and 5 by somatostatin receptor scintigraphy and immunohistochemistry: clinical implications in the diagnostic and therapeutic management of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Tumori*, 97 (5):620-628.
- Seol Y, Gentry AC, Osheroff N, Neuman KC. 2013. Chiral discrimination and writhing-dependent relaxation mechanism of human topoisomerase II $\alpha$ . *J Biol Chem*, 288 (19):13695-13703.

Seregni E, Ferrari L, Bajetta E, Martinetti A, Bombardieri E. 2001. Clinical significance of blood chromogranin A measurement in neuroendocrine tumours. *Ann Oncol*, 12 Suppl 2:S69-72.

Shi Y, Hu Y, Hu X, Li X, Lin L, Han X. 2015. Cisplatin combined with irinotecan or etoposide for untreated extensive-stage small cell lung cancer: A multicenter randomized controlled clinical trial. *Thorac Cancer*, 6 (6):785-791.

Siddiqui MT. 2010. Pulmonary neuroendocrine neoplasms: a review of clinicopathologic and cytologic features. *Diagn Cytopathol*, 38 (8):607-617.

Silva CB, Ongaratti BR, Trott G, Haag T, Ferreira NP, Leaes CG, Pereira-Lima JF, Oliveira Mda C. 2015. Expression of somatostatin receptors (SSTR1-SSTR5) in meningiomas and its clinicopathological significance. *Int J Clin Exp Pathol*, 8 (10):13185-13192.

Singh S, Hallet J, Rowsell C, Law CH. 2014. Variability of Ki67 labeling index in multiple neuroendocrine tumors specimens over the course of the disease. *Eur J Surg Oncol*, 40 (11):1517-1522.

Skarlos P, Christodoulou C, Kalogeras KT, Eleftheraki AG, Bobos M, Batistatou A, Valavanis C, Tzaida O, Timotheadou E, Kronenwett R, Wirtz RM, Kostopoulos I, Televantou D, Koutselini E, Papaspiropoulos I, Papadimitriou CA, Pectasides D, Gogas H, Aravantinos G, Pavlidis N, Arapantoni P, Skarlos DV, Fountzilias G. 2012. Triple-negative phenotype is of adverse prognostic value in patients treated with dose-dense sequential adjuvant chemotherapy: a translational research analysis in the context of a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) randomized phase III trial. *Cancer Chemother Pharmacol*, 69 (2):533-546.

Skov BG, Holm B, Erreboe A, Skov T, Møller A. 2010. ERCC1 and Ki67 in small cell lung carcinoma and other neuroendocrine tumors of the lung: distribution and impact on survival. *J Thorac Oncol*, 5 (4):453-459.

Stahel RA. 1991. Diagnosis, staging, and prognostic factors of small cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*, 3 (2):306-311.

Swarts DR, Ramaekers FC, Speel EJ. 2012. Molecular and cellular biology of neuroendocrine lung tumors: evidence for separate biological entities. *Biochim Biophys Acta*, 1826 (2):255-271.

Swarts DR, van Suylen RJ, den Bakker MA, van Oosterhout MF, Thunnissen FB, Volante M, Dingemans AM, Scheltinga MR, Bootsma GP, Pouwels HM, van den Borne BE, Ramaekers FC, Speel EJ. 2014. Interobserver variability for the WHO classification of pulmonary carcinoids. *Am J Surg Pathol*, 38 (10):1429-1436.

Syahrudin E, Oguri T, Takahashi T, Isobe T, Fujiwara Y, Yamakido M. 1998. Differential expression of DNA topoisomerase II alpha and II beta genes between small cell and non-small cell lung cancer. *Jpn J Cancer Res*, 89 (8):855-861.

Taal BG, Visser O. 2004. Epidemiology of neuroendocrine tumours. *Neuroendocrinology*, 80 Suppl 1:3-7.

- Takaki T, Trenz K, Costanzo V, Petronczki M. 2008. Polo-like kinase 1 reaches beyond mitosis--cytokinesis, DNA damage response, and development. *Curr Opin Cell Biol*, 20 (6):650-660.
- Takei H, Asamura H, Maeshima A, Suzuki K, Kondo H, Niki T, Yamada T, Tsuchiya R, Matsuno Y. 2002. Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of eighty-seven cases. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 124 (2):285-292.
- Takenaka T, Takenoyama M, Inamasu E, Yoshida T, Toyokawa G, Nosaki K, Hirai F, Yamaguchi M, Shimokawa M, Seto T, Ichinose Y. 2015. Role of surgical resection for patients with limited disease-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 88 (1):52-56.
- Talme T, Ivanoff J, Hagglund M, Van Neerven RJ, Ivanoff A, Sundqvist KG. 2001. Somatostatin receptor (SSTR) expression and function in normal and leukaemic T-cells. Evidence for selective effects on adhesion to extracellular matrix components via SSTR2 and/or 3. *Clin Exp Immunol*, 125 (1):71-79.
- Taniyama Y, Suzuki T, Mikami Y, Moriya T, Satomi S, Sasano H. 2005. Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study. *Endocr J*, 52 (5):605-611.
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. 2003. The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med*, 348 (12):1134-1149.
- Tokuyasu H, Sakaguchi Y, Isowa N, Izumi H, Takeda K, Miura H, Shimizu E. 2011. Large cell neuroendocrine carcinoma arising from the left main bronchus. *Intern Med*, 50 (18):2003-2006.
- Toumpanakis C, Caplin ME. 2013. Update on the role of somatostatin analogs for the treatment of patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Semin Oncol*, 40 (1):56-68.
- Toure A, Dorseuil O, Morin L, Timmons P, Jegou B, Reibel L, Gacon G. 1998. MgcRacGAP, a new human GTPase-activating protein for Rac and Cdc42 similar to *Drosophila* rotundRacGAP gene product, is expressed in male germ cells. *J Biol Chem*, 273 (11):6019-6023.
- Travis WD. 2010. Advances in neuroendocrine lung tumors. *Ann Oncol*, 21 Suppl 7:vii65-71.
- Travis WD, Rush W, Flieder DB, Falk R, Fleming MV, Gal AA, Koss MN. 1998. Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. *Am J Surg Pathol*, 22 (8):934-944.
- Tsuta K, Wistuba, II, Moran CA. 2012. Differential expression of somatostatin receptors 1-5 in neuroendocrine carcinoma of the lung. *Pathol Res Pract*, 208 (8):470-474.
- Tsuta K, Liu DC, Kalhor N, Wistuba, II, Moran CA. 2011. Using the mitosis-specific marker anti-phosphohistone H3 to assess mitosis in pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Clin Pathol*, 136 (2):252-259.
- Tsutsumi A, Takano H, Ichikawa K, Kobayashi S, Koike T. 1997. Expression of somatostatin receptor subtype 2 mRNA in human lymphoid cells. *Cell Immunol*, 181 (1):44-49.

- Unger N, Ueberberg B, Schulz S, Saeger W, Mann K, Petersenn S. 2012. Differential expression of somatostatin receptor subtype 1-5 proteins in numerous human normal tissues. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 120 (8):482-489.
- van Adrichem RC, Hofland LJ, Feelders RA, De Martino MC, van Koetsveld PM, van Eijck CH, de Krijger RR, Sprij-Mooij DM, Janssen JA, de Herder WW. 2013. Chromogranin A, Ki-67 index and IGF-related genes in patients with neuroendocrine tumors. *Endocr Connect*, 2 (4):172-177.
- Van Eeden S, Quaedvlieg PF, Taal BG, Offerhaus GJ, Lamers CB, Van Velthuysen ML. 2002. Classification of low-grade neuroendocrine tumors of midgut and unknown origin. *Hum Pathol*, 33 (11):1126-1132.
- van Essen M, Krenning EP, Bakker WH, de Herder WW, van Aken MO, Kwekkeboom DJ. 2007. Peptide receptor radionuclide therapy with <sup>177</sup>Lu-octreotate in patients with foregut carcinoid tumours of bronchial, gastric and thymic origin. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 34 (8):1219-1227.
- van Hoek M, Hofland LJ, de Rijke YB, van Nederveen FH, de Krijger RR, van Koetsveld PM, Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Feelders RA. 2009. Effects of somatostatin analogs on a growth hormone-releasing hormone secreting bronchial carcinoid, in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab*, 94 (2):428-433.
- van Velthuysen ML, Groen EJ, Sanders J, Prins FA, van der Noort V, Korse CM. 2014a. Reliability of proliferation assessment by Ki-67 expression in neuroendocrine neoplasms: eyeballing or image analysis? *Neuroendocrinology*, 100 (4):288-292.
- van Velthuysen ML, Groen EJ, van der Noort V, van de Pol A, Tesselaar ME, Korse CM. 2014b. Grading of neuroendocrine neoplasms: mitoses and Ki-67 are both essential. *Neuroendocrinology*, 100 (2-3):221-227.
- Viberti L, Papotti M, Abbona GC, Celano A, Filosso PL, Bussolati G. 1997. Value of Ki-67 immunostaining in preoperative biopsies of carcinomas of the lung. *Hum Pathol*, 28 (2):189-192.
- Volante M, Rosas R, Allia E, Granata R, Baragli A, Muccioli G, Papotti M. 2008. Somatostatin, cortistatin and their receptors in tumours. *Mol Cell Endocrinol*, 286 (1-2):219-229.
- Volante M, Brizzi MP, Faggiano A, La Rosa S, Rapa I, Ferrero A, Mansueto G, Righi L, Garancini S, Capella C, De Rosa G, Dogliotti L, Colao A, Papotti M. 2007. Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod Pathol*, 20 (11):1172-1182.
- Walts AE, Ines D, Marchevsky AM. 2012. Limited role of Ki-67 proliferative index in predicting overall short-term survival in patients with typical and atypical pulmonary carcinoid tumors. *Mod Pathol*, 25 (9):1258-1264.
- Wang H, Chen P, Liu XX, Zhao W, Shi L, Gu XW, Zhu CR, Zhu HH, Zong L. 2014. Prognostic impact of gastrointestinal bleeding and expression of PTEN and Ki-67 on primary gastrointestinal stromal tumors. *World J Surg Oncol*, 12 (1):89.

- Wang SM, Ooi LL, Hui KM. 2011. Upregulation of Rac GTPase-activating protein 1 is significantly associated with the early recurrence of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 17 (18):6040-6051.
- Warren WH, Faber LP, Gould VE. 1989. Neuroendocrine neoplasms of the lung. A clinicopathologic update. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 98 (3):321-332.
- Warth A, Fink L, Fisseler-Eckhoff A, Jonigk D, Keller M, Ott G, Rieker RJ, Sinn P, Soder S, Soltermann A, Willenbrock K, Weichert W, Pulmonary Pathology Working Group of the German Society of P. 2013. Interobserver agreement of proliferation index (Ki-67) outperforms mitotic count in pulmonary carcinoids. *Virchows Arch*, 462 (5):507-513.
- Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C. 2003. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov*, 2 (12):999-1017.
- Williams ED, Sandler M. 1963. The classification of carcinoid tumours. *Lancet*, 1 (7275):238-239.
- Withoff S, Smit EF, Meersma GJ, van den Berg A, Timmer-Bosscha H, Kok K, Postmus PE, Mulder NH, de Vries EG, Buys CH. 1994. Quantitation of DNA topoisomerase II alpha messenger ribonucleic acid levels in a small cell lung cancer cell line and two drug resistant sublines using a polymerase chain reaction-aided transcript titration assay. *Lab Invest*, 71 (1):61-66.
- Wolfe BA, Takaki T, Petronczki M, Glotzer M. 2009. Polo-like kinase 1 directs assembly of the HsCdk-4 RhoGAP/Ect2 RhoGEF complex to initiate cleavage furrow formation. *PLoS Biol*, 7 (5):e1000110.
- Wolin EM. 2012. The expanding role of somatostatin analogs in the management of neuroendocrine tumors. *Gastrointest Cancer Res*, 5 (5):161-168.
- Wu A, Jia Y, Dong B, Tang L, Liu Y, Du H, Yuan P, Dong P, Ji J. 2014a. Apoptosis and KI 67 index correlate with preoperative chemotherapy efficacy and better predict the survival of gastric cancer patients with combined therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 73 (5):885-893.
- Wu MJ, Ke PY, Horng JT. 2014b. RacGTPase-activating protein 1 interacts with hepatitis C virus polymerase NS5B to regulate viral replication. *Biochem Biophys Res Commun*, 454 (1):19-24.
- Wymenga AN, Eriksson B, Salmela PI, Jacobsen MB, Van Cutsem EJ, Fiasse RH, Valimaki MJ, Renstrup J, de Vries EG, Oberg KE. 1999. Efficacy and safety of prolonged-release lanreotide in patients with gastrointestinal neuroendocrine tumors and hormone-related symptoms. *J Clin Oncol*, 17 (4):1111.
- Xu YC, Zhang FC, Li JJ, Dai JQ, Liu Q, Tang L, Ma Y, Xu Q, Lin XL, Fan HB, Wang HX. 2015. RRM1, TUBB3, TOP2A, CYP19A1, CYP2D6: Difference between mRNA and protein expression in predicting prognosis of breast cancer patients. *Oncol Rep*, 34 (4):1883-1894.



- Yamada Y, Reisine T, Law SF, Ihara Y, Kubota A, Kagimoto S, Seino M, Seino Y, Bell GI, Seino S. 1992. Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase. *Mol Endocrinol*, 6 (12):2136-2142.
- Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. 2009. Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates. *Oncogene*, 28 (13):1570-1583.
- Yang QC, Zhu Y, Liou HB, Zhang XJ, Shen Y, Ji XH. 2013. A cocktail of MCM2 and TOP2A, p16INK4a and Ki-67 as biomarkers for the improved diagnosis of cervical intraepithelial lesion. *Pol J Pathol*, 64 (1):21-27.
- Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB. 2008. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol*, 26 (18):3063-3072.
- Yeh CM, Sung WW, Lai HW, Hsieh MJ, Yen HH, Su TC, Chang WH, Chen CY, Ko JL, Chen CJ. 2015. Opposing prognostic roles of nuclear and cytoplasmic RACGAP1 expression in colorectal cancer patients. *Hum Pathol*.
- Yuan P, Xu B, Wang C, Zhang C, Sun M, Yuan L. 2016. Ki-67 expression in luminal type breast cancer and its association with the clinicopathology of the cancer. *Oncol Lett*, 11 (3):2101-2105.
- Zabel BU, Naylor SL, Sakaguchi AY, Bell GI, Shows TB. 1983. High-resolution chromosomal localization of human genes for amylase, proopiomelanocortin, somatostatin, and a DNA fragment (D3S1) by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (22):6932-6936.
- Zahel T, Krysa S, Herpel E, Stenzinger A, Goeppert B, Schirmacher P, Hoffmann H, Schnabel PA, Warth A. 2012. Phenotyping of pulmonary carcinoids and a Ki-67-based grading approach. *Virchows Arch*, 460 (3):299-308.
- Zarogoulidis K, Eleftheriadou E, Kontakiotis T, Gerasimou G, Zarogoulidis P, Sapardanis I, Galaktidou G, Sakkas L, Gotzamani-Psarrakou A, Karatzas N. 2012. Long acting somatostatin analogues in combination to antineoplastic agents in the treatment of small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 76 (1):84-88.
- Zatelli MC, Maffei P, Piccin D, Martini C, Rea F, Rubello D, Margutti A, Culler MD, Sicolo N, degli Uberti EC. 2005. Somatostatin analogs in vitro effects in a growth hormone-releasing hormone-secreting bronchial carcinoid. *J Clin Endocrinol Metab*, 90 (4):2104-2109.
- Zhang P, Bai H, Fu C, Chen F, Zeng P, Wu C, Ye Q, Dong C, Song Y, Song E. 2015. RacGAP1-driven focal adhesion formation promotes melanoma transendothelial migration through mediating adherens junction disassembly. *Biochem Biophys Res Commun*, 459 (1):1-9.
- Zheng G, Ettinger DS, Maleki Z. 2013. Utility of the quantitative Ki-67 proliferation index and CD56 together in the cytologic diagnosis of small cell lung carcinoma and other lung neuroendocrine tumors. *Acta Cytol*, 57 (3):281-290.

---

Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, Jahn M, Jennewein M, Rosch F. 2007. Processing of generator-produced  $^{68}\text{Ga}$  for medical application. J Nucl Med, 48 (10):1741-1748.

# Anhang

## A) Supplemental Data Manuskript I

ORIGINAL ARTICLE

### Somatostatin Receptors in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms: New Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Markers

#### Supplemental data

**Table 1 Supplements.** Overview of the patient population

Study number	Sex	Age	Entity	IMMUNOHISTOCHEMISTRY					REAL-TIME RT-PCR					
				SSTR1	SSTR2A	SSTR3	SSTR4	SSTR5	SSTR1	SSTR2A	SSTR3	SSTR4	SSTR5	
NEN1	female	63.9	TC	primary	0	0	0	0	1	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN2	male	72.7	TC	primary	7	12	0	0	1	32.92	37.62	26.37	19.00	28.72
NEN3	female	18.2	TC	primary	12	9	0	6	1	35.45	35.85	19.00	22.89	33.09
NEN4	female	67.7	TC	primary	8	12	0	0	1	33.72	34.56	19.00	19.00	30.11
NEN5	female	69.4	TC	primary	8	7	0	0	11	33.03	32.64	19.00	19.00	34.05
NEN6	female	65.5	TC	primary	10	0	0	0	1	29.26	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN7	female	62.5	TC	primary	8	0	1	2	11	-	-	-	-	-
NEN8	male	51.9	TC	primary	10	12	-	4	2	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN9	female	76.4	TC	primary	11	1	1	2	7	34.37	19.00	19.00	19.00	31.91
NEN10	female	56.7	TC	primary	10	12	-	0	2	-	-	-	-	-
NEN11	female	81.0	TC	primary	7	8	0	0	7	19.00	34.96	19.00	25.16	31.42
NEN12	male	21.3	TC	metastasis	4	9	0	6	0	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN13	female	68.7	TC	primary	8	10	0	0	11	34.75	35.65	19.00	19.00	32.98
NEN14	male	60.1	TC	primary	6	0	0	1	5	-	-	-	-	-
NEN15	male	78.6	TC	primary	4	9	0	0	1	33.61	34.61	19.00	19.00	32.76
NEN16	female	72.1	TC	primary	6	0	0	3	1	-	-	-	-	-
NEN17	female	54.1	TC	primary	7	2	0	1	7	-	-	-	-	-
NEN18	female	53.2	TC	primary	2	1	0	0	1	19.00	19.00	19.00	19.00	31.75
NEN19	female	50.3	TC	primary	6	0	1	0	6	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN20	female	68.7	TC	primary	3	2	1	1	6	27.16	19.00	19.00	26.03	19.00
NEN21	male	52.3	TC	primary	6	2	0	1	4	-	-	-	-	-
NEN22	female	63.1	TC	primary	0	0	2	6	1	19.00	19.00	19.00	19.00	30.03
NEN23	female	68.7	TC	primary	0	0	0	0	1	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN24	female	48.8	TC	primary	1	0	0	0	1	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN25	female	57.0	TC	primary	7	2	0	0	6	22.10	19.00	19.00	30.56	29.73
NEN26	male	54.5	TC	primary	1	12	0	0	0	33.03	34.51	19.00	19.00	32.17
NEN27	female	69.5	AC	primary	8	0	1	1	3	29.35	24.89	19.00	19.00	29.46
NEN28	female	60.1	AC	metastasis	4	0	0	1	6	32.62	23.90	19.00	23.97	32.13
NEN29	male	43.1	AC	metastasis	2	3	0	0	0	19.00	34.90	19.00	23.46	31.84
NEN30	male	65.3	AC	primary	7	0	0	0	3	-	-	-	-	-
NEN31	female	75.6	AC	primary	8	0	0	3	11	19.00	19.00	23.76	19.00	25.22
NEN32	female	71.8	AC	primary	7	0	0	0	0	32.97	19.00	19.00	19.00	26.19
NEN33	female	29.6	AC	metastasis	8	0	0	0	5	-	-	-	-	-
NEN34	male	62.0	AC	primary	3	2	0	0	0	33.40	33.65	19.00	19.00	28.43
NEN35	male	44.9	AC	metastasis	3	4	0	6	6	-	-	-	-	-
NEN36	male	72.9	AC	metastasis	7	6	2	1	2	31.02	37.17	19.00	27.25	21.49
NEN37	male	70.1	AC	primary	2	0	0	0	0	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN38	male	76.4	AC	primary	6	9	0	0	8	-	-	-	-	-
NEN39	male	51.5	AC	primary	2	7	0	0	0	19.00	34.73	19.00	19.00	24.11
NEN40	female	24.6	AC	primary	4	11	0	0	5	33.92	35.56	19.00	19.00	33.81
NEN41	female	44.9	AC	primary	3	3	0	0	4	34.95	19.00	19.00	19.00	27.13
NEN42	female	67.6	AC	primary	7	2	0	1	6	-	-	-	-	-
NEN43	male	75.6	AC	primary	4	0	0	0	3	33.74	25.88	19.00	30.32	27.63
NEN44	male	48.2	AC	primary	1	1	4	0	2	19.00	19.00	19.00	19.00	30.67
NEN45	male	61.5	AC	primary	5	6	0	0	12	-	-	-	-	-
NEN46	male	60.2	AC	metastasis	3	12	2	0	7	32.38	36.46	19.00	19.00	30.15

doi: 10.1210/jc.2014-2699

J Clin Endocrinol Metab, March 2015, 100(3):831–840

jcem.endojournals.org

NEN47	female	47.4	AC	primary	1	0	0	0	1	30.33	22.57	19.00	31.49	30.85
NEN48	female	66.2	AC	metastasis	3	12	2	0	7	-	-	-	-	-
NEN49	female	62.1	AC	primary	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
NEN50	male	59.4	AC	metastasis	3	0	0	0	5	-	-	-	-	-
NEN51	female	66.1	AC	primary	8	0	1	0	8	-	-	-	-	-
NEN52	male	76.3	AC	primary	5	8	0	0	9	32.73	35.54	19.00	19.00	28.94
NEN53	male	18.2	AC	primary	2	9	0	0	1	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN54	female	51.2	AC	primary	9	8	2	2	12	33.46	33.19	19.00	29.99	29.35
NEN55	female	65.1	AC	primary	2	1	0	0	1	30.18	31.66	19.00	27.85	27.45
NEN56	female	62.1	AC	primary	0	2	0	0	3	19.00	19.00	19.00	19.00	24.17
NEN57	male	57.8	SCLC	primary	0	1	0	2	8	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN58	female	63.3	SCLC	primary	0	8	-	0	1	19.00	33.56	19.00	30.72	24.74
NEN59	female	65.3	SCLC	metastasis	0	6	0	0	0	19.00	28.73	19.00	19.00	28.71
NEN60	male	56.4	SCLC	metastasis	0	12	0	0	1	-	-	-	-	-
NEN61	male	69.5	SCLC	metastasis	5	5	0	4	0	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN62	male	78.8	SCLC	primary	2	12	0	4	0	19.00	38.12	19.00	24.89	19.00
NEN63	male	66.9	SCLC	primary	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
NEN64	male	65.3	SCLC	primary	1	6	0	0	0	19.00	33.97	19.00	19.00	32.82
NEN65	female	64.7	SCLC	metastasis	0	0	0	0	0	19.00	19.00	19.00	19.00	27.16
NEN66	female	46.9	SCLC	metastasis	1	5	0	0	0	29.52	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN67	female	69.1	SCLC	metastasis	0	0	-	4	0	-	-	-	-	-
NEN68	male	51.0	SCLC	primary	0	0	0	0	3	19.00	19.00	19.00	19.00	32.26
NEN69	male	60.7	SCLC	metastasis	0	3	0	0	0	-	-	-	-	-
NEN70	male	54.7	SCLC	primary	1	1	0	0	0	-	-	-	-	-
NEN71	male	79.6	SCLC	primary	0	0	0	8	0	-	-	-	-	-
NEN72	female	53.2	SCLC	primary	2	0	0	3	10	-	-	-	-	-
NEN73	female	58.9	SCLC	metastasis	3	1	0	0	5	-	-	-	-	-
NEN74	male	50.6	SCLC	primary	1	9	0	0	1	-	-	-	-	-
NEN75	male	60.2	SCLC	primary	1	6	0	4	0	19.00	33.52	19.00	19.00	19.00
NEN76	female	54.0	SCLC	primary	0	2	4	0	1	-	-	-	-	-
NEN77	male	71.3	SCLC	primary	3	0	1	0	5	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN78	female	54.2	SCLC	primary	1	1	0	0	0	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN79	male	75.7	SCLC	primary	4	10	1	2	6	19.00	34.97	19.00	19.00	29.54
NEN80	female	62.1	SCLC	primary	2	1	0	0	0	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN81	male	47.3	SCLC	primary	2	1	0	0	10	19.00	31.63	19.00	30.60	23.56
NEN82	female	49.3	SCLC	primary	1	12	0	0	2	19.00	35.19	19.00	24.46	28.56
NEN83	male	43.4	SCLC	metastasis	6	0	0	0	10	-	-	-	-	-
NEN84	male	55.2	SCLC	primary	2	2	3	0	10	-	-	-	-	-
NEN85	male	69.0	SCLC	primary	1	4	4	0	1	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
NEN86	male	61.0	SCLC	primary	2	4	0	0	0	19.00	33.02	19.00	19.00	30.06
NEN87	male	68.9	SCLC	primary	1	11	1	1	3	-	-	-	-	-
NEN88	male	50.8	SCLC	primary	5	0	1	1	8	-	-	-	-	-
NEN90	female	49.5	SCLC	primary	0	10	0	0	0	19.00	34.60	19.00	19.00	28.33
NEN91	female	52.7	SCLC	primary	1	1	2	0	0	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00

NEN89 was excluded after histological reevaluation. “-”:not tested.

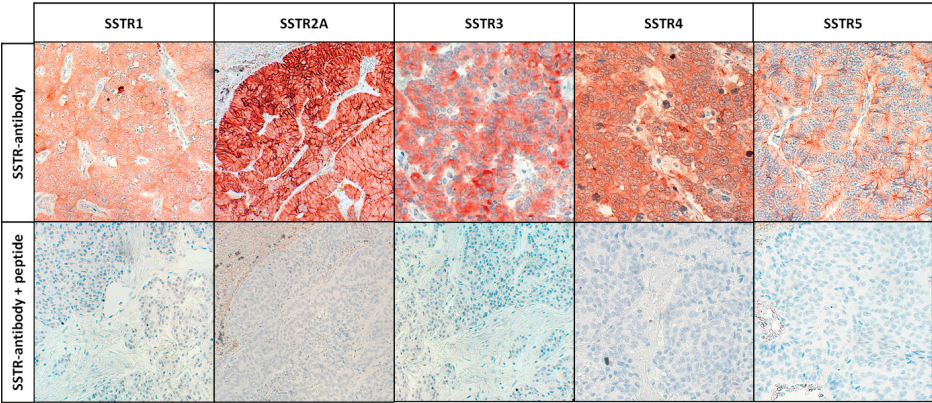
**Table 2 Supplements.** Comparison of the SSTR frequency distribution of the current study with the results of Tsuta et. al (2012)

	TC		AC		SCLC	
	Tsuta et al.	Kaemmerer, Specht et al.	Tsuta et al.	Kaemmerer, Specht et al.	Tsuta et al.	Kaemmerer, Specht et al.
<b>SSTR1</b>	79.7 % (n=56)	76.9 % (n=26)	77.8 % (n=9)	66.7 % (n=30)	27.6 % (n=54)	14.7 % (n=34)
<b>SSTR2A</b>	96.6 % (n=58)	42.3 % (n=26)	77.8 % (n=9)	43.3 % (n=30)	59.0 % (n=56)	47.1 % (n=34)
<b>SSTR3</b>	49.1 % (n=57)	0.0 % (n=26)	33.3 % (n=9)	3.3 % (n=30)	15.5 % (n=56)	9.4 % (n=34)
<b>SSTR4</b>	5.2 % (n=58)	19.2 % (n=26)	0.0 % (n=9)	10.0 % (n=30)	0.0 % (n=58)	17.6 % (n=34)
<b>SSTR5</b>	0.0 % (n=57)	42.3 % (n=26)	0.0 % (n=9)	60.0 % (n=30)	3.4 % (n=55)	29.4 % (n=34)

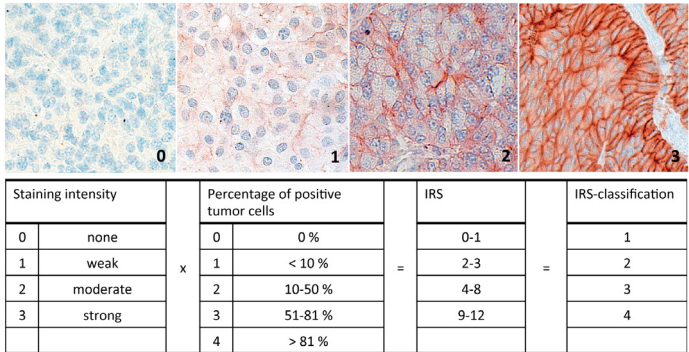
doi: 10.1210/jc.2014-2699

J Clin Endocrinol Metab, March 2015, 100(3):831–840

jcem.endojournals.org

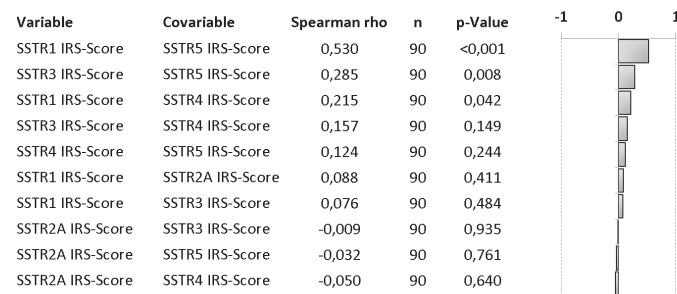


**Figure 1 Supplements.** Peptide neutralization of the SSTR immunostains. Depicted are the immunostains of the somatostatin receptor subtypes SSTR1, SSTR2A, SSTR3, SSTR4, and SSTR5 (above), together with the respective peptide neutralizations on a serial section (below). Two hours of incubation of the antibodies with their corresponding peptides led to a complete abolishment of the respective immunostains, further confirming the specificity of the anti-SSTR antibodies used.

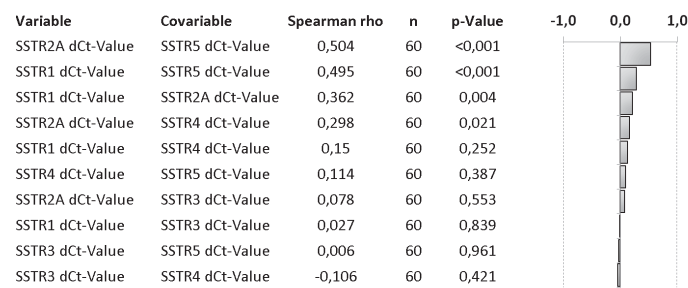


**Figure 2 Supplements.** Immunoreactive Score according to Remmele and Stegner. The photomicrographs above represent the four gradations of the immunohistochemical staining intensity: 0 means no staining, 1 means weak, 2 moderate and 3 strong immunoreactivity. The table below shows the calculation of the Immunoreactive Score (IRS) and the resulting IRS-classification.

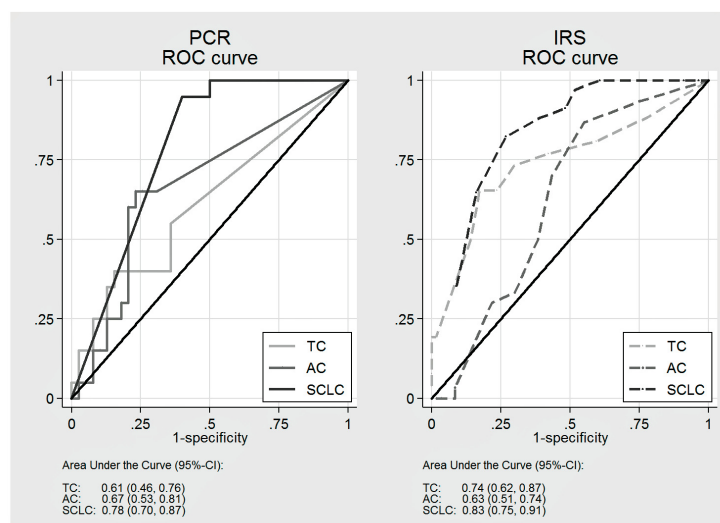




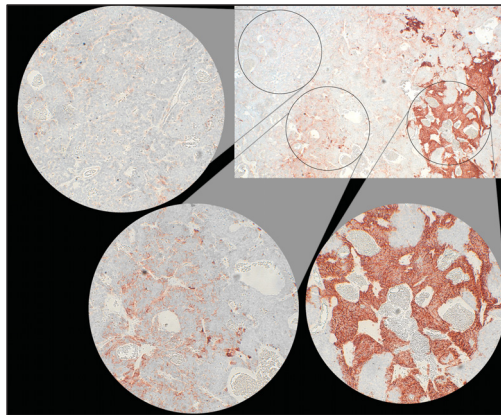
**Figure 3 Supplements.** Spearman rank correlation of the SSTR subtypes expression of as evaluated by immunohistochemistry. Depicted are the IRS score of one SSTR subtype as a variable and the IRS score of another SSTR subtype as a covariate. The Spearman rho and corresponding p-value are illustrated in the bar chart. In total, data from 90 patients were evaluated.



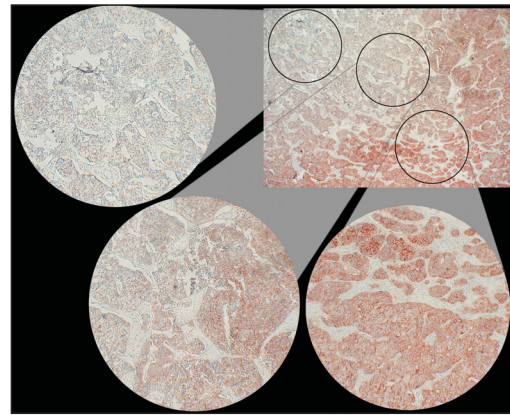
**Figure 4 Supplements.** Spearman rank correlation of the SSTR subtypes expression of as evaluated by RT-qPCR. Depicted are the dCt values of one SSTR subtype as a variable and the dCt values of another SSTR subtype as a covariate. The Spearman rho and corresponding p-value are illustrated in the bar chart. In total, data from 60 patients were evaluated.



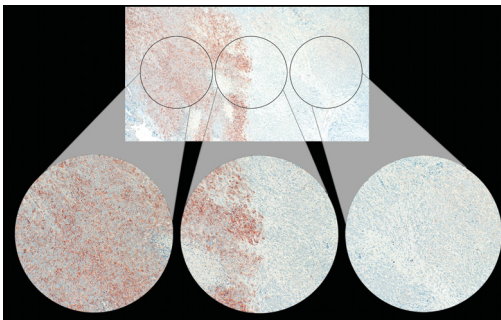
**Figure 5 Supplements.** ROC analysis of SSTR1 in immunohistochemistry and in RT-qPCR. According to the ROC analysis the SSTR1 expression level is clearly well suited as cut-off-marker between the tumor entities (AUC always distinctly higher than 0.5), the IHC (probably due to higher case numbers) being somewhat better in this respect as compared to the PCR. IRS – Immunoreactive Score; TC – Typical carcinoids; AC – atypical carcinoids; SCLC – small cell lung cancer.



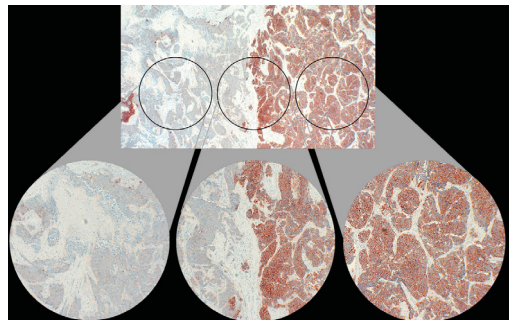
**Figure 6 Supplements.** Heterogeneity of the SSTR expression 1. Exemplary a heterogeneous SSTR-expression pattern of one tumor sample is depicted. Three TMA's with 1.00 mm diameter were drawn, which would result in three different ratings for the same tumor specimen (left: IRS = 1, middle: IRS = 4, right: IRS = 12).



**Figure 7 Supplements.** Heterogeneity of the SSTR expression 2. Exemplary a heterogeneous SSTR-expression pattern of one tumor sample is depicted. Three TMA's with 1.00 mm diameter were drawn, which would result in three different ratings for the same tumor specimen (left: IRS = 0, middle: IRS = 4, right: IRS = 10).



**Figure 8 Supplements.** Heterogeneity of the SSTR expression 3. Exemplary a heterogeneous SSTR-expression pattern of one tumor sample is depicted. Three TMA's with 1.00 mm diameter were drawn, which would result in three different ratings for the same tumor specimen (left: IRS = 8, middle: IRS = 5, right: IRS = 0).



**Figure 9 Supplements.** Heterogeneity of the SSTR expression 4. Exemplary a heterogeneous SSTR-expression pattern of one tumor sample is depicted. Three TMA's with 1.00 mm diameter were drawn, which would result in three different ratings for the same tumor specimen (left: IRS = 1, middle: IRS = 6, right: IRS = 12).

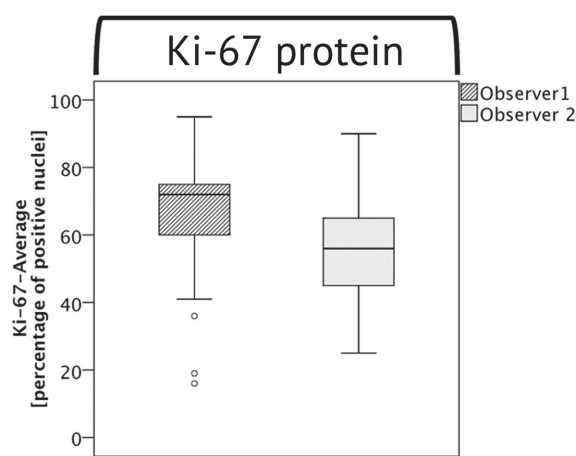
## B) Supplemental Data Manuscript III

[www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)

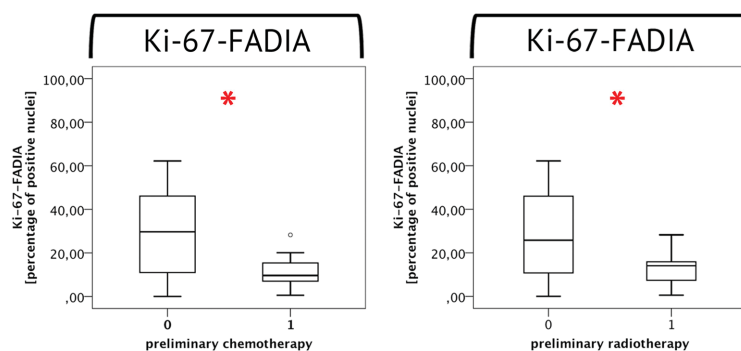
Oncotarget, Supplementary Materials 2016

### Comparative evaluation of three proliferation markers, Ki-67, TOP2A, and RacGAP1, in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms: Issues and prospects

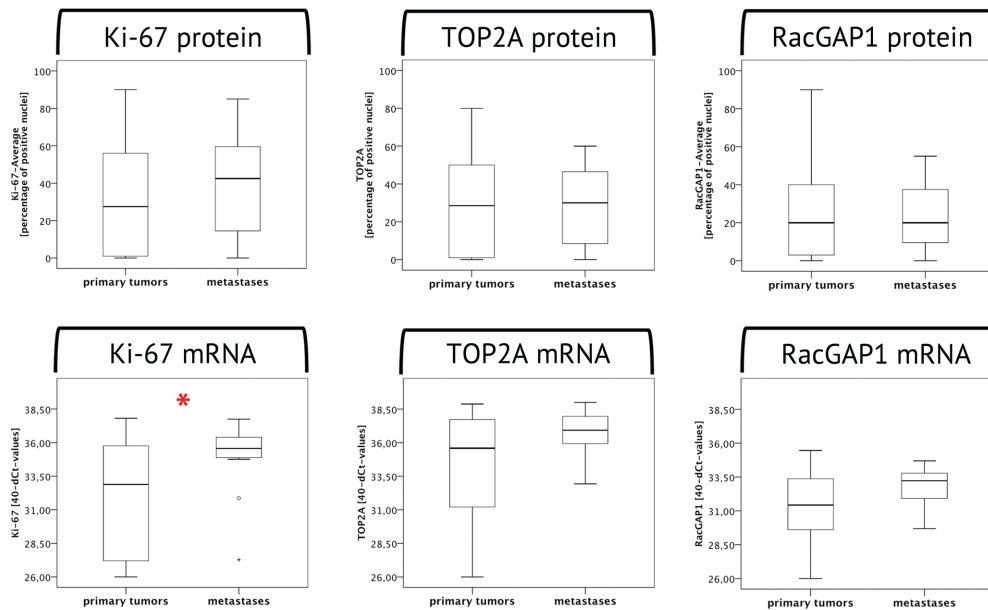
#### Supplementary Materials



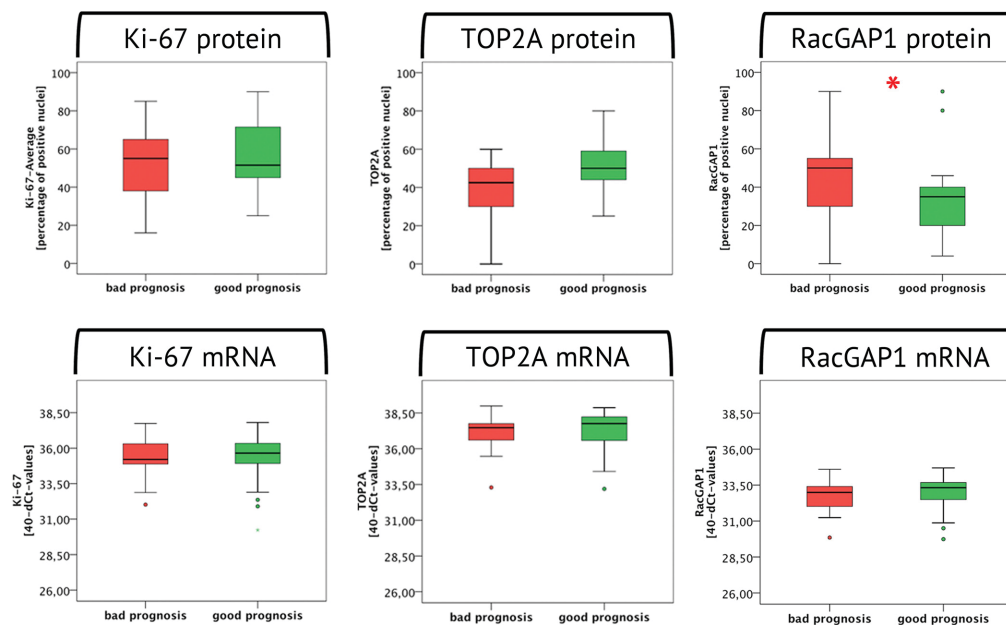
**Supplementary Figure S1: Inter-observer variability of Ki-67 IHC.** The boxplots are depicting the inter-observer variability: two observers independently investigated 22 randomly selected SCLC tumor samples by evaluating the Ki-67-Average by manual counting.



**Supplementary Figure S2: Ki-67 expression vs. radiotherapy / chemotherapy.** The boxplots are depicting the different Ki-67 expression levels of tumor samples before (0) and after (1) treatment with chemotherapy or radiotherapy as evaluated by means of Ki-67-FAIDA. Asterisks indicate significant differences according to the Mann-Whitney-Test.



**Supplementary Figure S3: Proliferation marker expression in primary tumors vs. metastases.** The boxplots are depicting the protein (above) and mRNA (below) expression levels of Ki-67, TOP2A and RacGAP1 in primary tumors and metastases. Asterisks indicate significant differences according to the Mann-Whitney-Test.



**Supplementary Figure S4: Proliferation marker expression in SCLC with good and poor prognosis.** The boxplots are depicting the protein and mRNA levels of Ki-67, TOP2A and RacGAP1 in SCLC with good prognosis (green,  $n = 28$ , survival  $\geq 30$  months) and poor prognosis (red,  $n = 21$ , survival  $< 30$  months). Asterisks indicate significant differences according to the Mann-Whitney-Test.



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp und Herrn PD Dr. med. Daniel Kämmerer für die engagierte und qualifizierte Betreuung dieser Arbeit, viele konstruktive Ratschläge und Diskussionen und nicht zuletzt für die gute Arbeitsatmosphäre danken. Durch ihre Unterstützung haben Sie mir ein selbstständiges, wissenschaftliches Arbeiten ermöglicht und mit Ihrer Bereitschaft zur kooperativen Zusammenarbeit wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Oliver Werz danke ich für die freundliche Betreuung von pharmazeutischer Seite sowie die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. Ralph M. Wirtz und dem STRATIFYER Team, Herrn Dr. rer. nat. Jörg Sängler und den weiteren Mitarbeitern des Institutes für Pathologie und Zytologie Bad Berka, Frau Dr. rer. nat. Maria Athellogou und der DEFINIENS AG sowie Herrn Prof. Dr. med. Stefan Schulz für zahlreiche Ratschläge und die stetige Hilfe bei vielen Angelegenheiten.

Allen Mitarbeitern der AG Lupp danke ich für das freundschaftliche Arbeitsklima.

Zu guter Letzt danke ich Johannes und meinen Eltern für ihre beständige moralische Rückenstärkung.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. Daniel Kämmerer, apl. Prof. Dr. med. habil. Amelie Lupp,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, im Juni 2016

Elisa Neubauer

---

# Curriculum Vitae

## Persönliches

---

Elisa Neubauer, geb. Specht

Geboren am 28.05.1988 in Eisenach

## Schulische Ausbildung

---

September 1999 – Juni 2007	Philipp Melanchthon Gymnasium Gerstungen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
----------------------------	--

## Studium und Promotion

---

Oktober 2007 – Oktober 2011	Studium der Pharmazie an der FSU Jena
<i>August 2009</i>	1. Staatsexamen
<i>September 2011</i>	2. Staatsexamen
November 2011 – April 2012	Praktisches Jahr bei der JenaHEXAL / EVER Pharma GmbH
Mai 2012 – Oktober 2012	Postgradualer Studiengang zur Diplom-Pharmazeutin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena
November 2012 – Mai 2013	Praktisches Jahr in der West-Apotheke Jena
Juni 2013	3. Staatsexamen / Approbation als Apothekerin
Seit Juni 2013	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena
Oktober 2015	Examenspreis des Präsidenten 2015 der FSU Jena für die Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

---

## Wissenschaftliche Beiträge

### Publikationen in Fachzeitschriften

---

Kaemmerer D\*, Specht E\*, Sänger J, Wirtz RM, Sayeg M, Schulz S, Lupp A. 2015a. Somatostatin Receptors in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms: New Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Markers. J Clin Endocrinol Metab, 100 (3):831-840.

Kaemmerer D, Reimann C, Specht E, Wirtz RM, Sayeg M, Baum RP, Schulz S, Lupp A. 2015b. Differential Expression and Prognostic Value of the Chemokine Receptor CXCR4 in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms. Oncotarget, 6 (5):3346-3358.

Kaemmerer D, Wirtz RM, Fischer EK, Hommann M, Sänger J, Prasad V, Specht E, Baum RP, Schulz S, Lupp A. 2015c. Analysis of Somatostatin Receptor 2A Immunohistochemistry, RT-qPCR, and *In Vivo* PET/CT Data in Patients with Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm. Pancreas, 44 (4):648-654.

Specht E, Kaemmerer D, Sänger J, Wirtz RM, Schulz S, Lupp A. 2015. Comparison of Immunoreactive Score, HER2/neu Score and H Score for the Immunohistochemical Evaluation of Somatostatin Receptors in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms. Histopathology, 67 (3):368-377.

Neubauer E, Wirtz RM, Kaemmerer D, Athellogou M, Schmidt L, Sänger J, Lupp A. 2016. Comparative Evaluation of Three Proliferation Markers, Ki-67, TOP2A, and RacGAP1, in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms: Issues and Prospects. Oncotarget, DOI:10.18632/oncotarget.9747.

### Kongressbeitrage als Erstautor

---

E. Specht, D. Kaemmerer, R.M. Wirtz, J. Sänger, A. Lupp. „Somatostatinrezeptoren pulmonaler neuroendokriner Neoplasien – Neue Targets in der pathologischen Diagnostik“.

Vortrag auf dem „4. Mitteldeutschen Symposium Neuroendokriner Tumore“ in Weimar, Juni 2013.

---

E. Specht, D. Kaemmerer, S. Schulz, R.P. Baum, R.M. Wirtz, A. Lupp. „Somatostatin Receptor Subtypes SSTR1-SSTR5 in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms: An Immunohistochemical and qRT-PCR-based Analysis of 167 Tumors“.

Vortrag auf der „DGHO Jahrestagung 2013“ in Wien, Oktober 2013.

E. Specht, R.M. Wirtz, D. Kaemmerer, S. Schulz, R.P. Baum, A. Lupp „The Assessment of Proliferation in BP-NEN Entities Based on the Three Proliferation Markers Ki-67, TOP2A and RacGAP1“.

Poster auf der „ENETS Annual Conference 2014“ in Barcelona, März 2014.

E. Specht, D. Kaemmerer, R.M. Wirtz, J. Sängler, S. Schulz, R.P. Baum, A. Lupp. „Immunohistochemical and qRT-PCR-based Evaluation of Somatostatin Receptor 1 to 5 Expression in 92 Patients with Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms“.

Poster auf der „ENETS Annual Conference 2014“ in Barcelona, März 2014.

E. Specht, D. Kaemmerer, R.M. Wirtz, J. Sängler, S. Schulz, R.P. Baum, A. Lupp. “Characterization of Somatostatin Receptors, Chromogranin A and Ki-67 in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms”.

Poster auf dem „IZKF-Doktoranden-Symposium“ in Dornburg, April 2014.

E. Specht, D. Kaemmerer, R.M. Wirtz, S. Schulz, C. Werner, A. Lupp. „Expression of Somatostatin Receptors and Proliferation Markers in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms and Implications for a Somatostatin Analogue Based Therapy“.

Poster auf der „DGHO Jahrestagung 2014“ in Hamburg, Oktober 2014.

E. Neubauer, R.M. Wirtz, D. Kaemmerer, C. Reimann, L. Schmidt, J. Sängler, A. Lupp. „RacGAP1 – A Novel Marker for Tumor Progression and Invasion in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms?“

Poster auf der „DGHO Jahrestagung 2015“ in Basel, Oktober 2015. Preisträger - Posterpreis.